



**Universidad Autónoma de Madrid**

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

**UTILIDAD DE LA FARMACOGENÉTICA  
PARA PREDECIR LA EFICACIA Y  
SEGURIDAD DE LA RISPERIDONA EN  
EL TRATAMIENTO DE LA  
ESQUIZOFRENIA**

Memoria que presenta Berta Almoguera Castillo para optar al Grado de  
Doctor

Directores:

Dra. Carmen Ayuso García

Dr. Rafael Dal-Ré

2011

# *Índice*

<b>ÍNDICE DE ECUACIONES, FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA A LOS FÁRMACOS Y FARMACOGENÉTICA.....</b>	<b>29</b>
1.1. Factores que afectan la respuesta a los fármacos. Farmacocinética y farmacodinamia.....	29
1.2. Factores genéticos de variabilidad inter-individual .....	31
1.2.1. Factores genéticos de variabilidad inter-individual.....	31
1.2.1.1. Polimorfismos de tipo SNP.....	31
1.2.1.2. Inserciones y deleciones de 1 a 100 pares de bases (indels) .....	32
1.2.1.3. Variaciones en el número de copias (CNVs).....	32
1.2.2. SNPs comunes y proyecto internacional <i>HapMap</i> .....	33
<b>2. LA FARMACOGENÉTICA .....</b>	<b>34</b>
2.1. Importancia clínica de la farmacogenética.....	34
2.2. Tipos de estudios en farmacogenética.....	37
2.3. Farmacogenética en la práctica clínica actual .....	39
<b>3. IMPORTANCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA .....</b>	<b>40</b>
<b>4. LA ESQUIZOFRENIA.....</b>	<b>41</b>
4.1. Síntomas y diagnóstico de la esquizofrenia .....	42
4.2. Factores de riesgo.....	45
4.2.1. Factores ambientales .....	45
4.2.2. Factores genéticos .....	46
4.3. Etiología .....	49
4.3.1. Vías dopaminérgicas .....	49
4.3.2. Hipótesis dopaminérgica .....	51

4.3.3. Hipótesis glutamatérgica .....	51
4.3.4. Hipótesis serotoninérgica .....	52
4.4. Tratamiento .....	52
4.4.1. Mecanismo de acción y eficacia de los antipsicóticos .....	53
4.4.2. Efectos adversos .....	55
<b>5. FARMACOGENÉTICA DE LA RISPERIDONA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA .....</b>	<b>58</b>
5.1. Farmacocinética, farmacodinamia y efectos adversos .....	58
5.2. Farmacogenética de risperidona. Genes asociados .....	59
5.2.1. Genes farmacocinéticos.....	59
5.2.1.1. Genes implicados en el metabolismo de la risperidona. CYP2D6 y CYP3A4.....	59
5.2.1.2. Genes implicados en el trasnpo de la risperidona. CYP2D6 y CYP3A4.....	61
5.2.2. Genes farmacodinámicos.....	61
5.2.2.1. Receptores dopaminérgicos.....	62
5.2.2.2. Genes serotoninérgicos .....	63
5.2.3. Otros genes .....	63
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>1. SUJETOS .....</b>	<b>71</b>
1.1. Pacientes.....	71
1.1.1. Criterios de inclusión.....	71
1.1.2. Variables demográficas y clínicas.....	71
1.2. Controles .....	72
1.2.1. Criterios de inclusión.....	72
1.3. Criterios de exclusión de los sujetos .....	72
<b>2. ESCALAS UTILIZADAS EN LOS PACIENTES PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA RISPERIDONA .....</b>	<b>73</b>



2.1. Escala PANSS.....	73
2.2. Escala UKU de efectos secundarios.....	73
<b>3. GENOTIPADO.....</b>	<b>74</b>
3.1. Obtención de ADN.....	74
3.1.1. Extracción automática.....	74
3.1.2. Extracción manual.....	74
3.1.3. Determinación de la concentración del ADN.....	74
3.2. Genotipado con <i>PHARMAChip</i> ®.....	75
3.3. Otros métodos de genotipado.....	78
3.3.1. Análisis de fragmentos. Genotipado de <i>SLC6A4</i> .....	78
3.3.2. Genotipado de CYP2D6.....	79
3.3.2.1. Determinación de los alelos *3, *4, *6, *9 y *10.....	79
3.3.2.2. Determinación de las deleciones (*5) y las duplicaciones (*1XN y *2XN).....	79
3.3.3. Discriminación alélica mediante PCR a tiempo real.....	80
3.3.3.1. Sondas.....	80
3.3.3.2. Condiciones .....	80
3.3.4. Secuenciación.....	81
3.3.4.1. Cebadores utilizados .....	81
3.3.4.2. Condiciones de la PCR.....	82
3.3.4.3. Condiciones de la reacción de secuenciación.....	82
<b>4. ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>83</b>
4.1. Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas y estimación del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	84
4.1.1. Frecuencias alélicas y genotípicas.....	84
4.1.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	84
4.2. Recodificación de <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>NAT2</i> y <i>TPMT</i> .....	84
4.2.1. Codificación de los genotipos de los genes del citocromo P-450 .....	85
4.2.1.1. <i>CYP2C19</i> y <i>CYP2C9</i> .....	85
4.2.1.2. <i>CYP2D6</i> .....	85
4.2.2. Codificación de los genes del metabolismo en fase II .....	86

4.2.2.1. <i>NAT2</i> .....	86
4.2.2.2. <i>TPMT</i> .....	86
4.3. Determinación de las características analíticas de <i>PHARMAChip®</i> .....	87
4.3.1. Tasa de genotipado.....	87
4.3.1.1. <i>Tasa de genotipado del total de muestras</i> .....	87
4.3.1.2. <i>Tasa de genotipado del total de genotipos</i> .....	87
4.3.2. Sensibilidad y especificidad de <i>PHARMAChip®</i> .....	87
4.3.3. Precisión en la determinación de los genotipos de <i>SLC6A4</i> e <i>IL-10</i> .....	88
4.4. Selección de la población de referencia para la comparación con nuestra población. HapMap.....	88
4.5. Selección de las variantes genéticas.....	89
4.5.1. Selección de las variantes genéticas para el estudio farmacogenético.....	89
4.5.2. Selección de las variantes genéticas para el estudio de asociación con la esquizofrenia.....	89
4.6. Desarrollo del estudio farmacogenético.....	91
4.6.1. Estudio farmacogenético de seguridad de risperidona.....	93
4.6.2. Estudio farmacogenético de eficacia de risperidona.....	93
4.7. Diseño del estudio de asociación con la esquizofrenia. Estudio de casos y controles.....	93
4.7.1. Estudio de asociación de las variantes genéticas seleccionadas de <i>PHARMAChip®</i> con la esquizofrenia.....	94
4.7.2. Estudio de asociación de los haplotipos del promotor del gen <i>IL-10</i> con la esquizofrenia.....	94
4.8. Herramientas bioinformáticas utilizadas en este trabajo.....	95
4.8.1. Programas informáticos.....	95
4.8.2. Bases de datos consultadas.....	95

## **RESULTADOS..... 99**

<b>1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....</b>	<b>99</b>
1.1. Variables demográficas.....	99
1.1.1. Edad.....	99
1.1.2. Sexo.....	99

1.2. Variables clínicas .....	100
1.2.1. Dosis de risperidona .....	100
1.2.2. Tiempo de ingreso .....	100
1.2.3. Tratamientos concomitantes .....	101
1.2.4. Efectos adversos .....	102
1.2.5. Escala PANSS .....	104
1.3. Variantes genéticas .....	106
1.3.1. Variantes genéticas incluidas en <i>PHARMAChip</i> ® .....	106
1.3.2. Resto de las variantes .....	106
 <b>2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE</b>	
<b><i>PHARMAChip</i>® .....</b>	<b>108</b>
2.1. Tasa de genotipado .....	108
2.1.1. Tasa de genotipado del total de muestras .....	108
2.1.2. Tasa de genotipado del total de genotipos .....	108
2.2. Sensibilidad y especificidad de <i>PHARMAChip</i> ® .....	109
2.3. Precisión en la detección de genotipos .....	110
 <b>3. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES</b>	
<b>INCLUIDAS EN <i>PHARMAChip</i>® Y DE METABOLIZADORES LENTOS DE</b>	
<b>LAS PRINCIPALES ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS EN</b>	
<b>LA POBLACIÓN CONTROL ESPAÑOLA .....</b>	<b>111</b>
3.1. Frecuencias alélicas. Comparación con la población de referencia .....	111
3.2. Frecuencias genotípicas. Comparación con la población de referencia .....	111
3.3. Frecuencias de metabolizadores lentos de las principales enzimas del	
metabolismo de fase I y II .....	118
 <b>4. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE SEGURIDAD</b>	
<b>DE RISPERIDONA .....</b>	<b>119</b>
4.1. Asociación de los genotipos con los efectos adversos .....	119
4.2. Ajuste del efecto por las variables demográficas y clínicas .....	120

<b>5. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE EFICACIA</b>	
<b>DE RISPERIDONA .....</b>	<b>123</b>
5.1. Estudio de eficacia medida como cambio en la escala PANSS total .....	123
5.2. Estudio de eficacia medida como cambio en la escala PANSS negativa.....	124
5.3. Estudio de eficacia medida como cambio en la escala PANSS positiva .....	124
<b>6. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON LA ESQUIZOFRENIA .....</b>	<b>125</b>
6.1. Estudio de asociación con las variantes genéticas seleccionadas de <i>PHARMAChip</i> ®.....	125
6.1.1. Análisis global.....	125
6.1.2. Análisis estratificado por sexo.....	126
6.2. Estudio de asociación caso-control con los haplotipos del promotor del gen <i>IL-10</i> .....	127
6.2.1. Determinación de los haplotipos del promotor del gen <i>IL-10</i> .....	127
6.2.2. Análisis sin estratificar .....	127
6.2.3. Análisis estratificado por sexo.....	128
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>1. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE</b>	
<b><i>PHARMAChip</i>®.....</b>	<b>135</b>
<b>2. FRECUENCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS Y DE METABOLIZADORES</b>	
<b>LENTOS DE LAS VARIANTES INCLUIDAS EN <i>PHARMAChip</i>® EN</b>	
<b>POBLACIÓN ESPAÑOLA.....</b>	<b>138</b>
2.1. Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas incluidas en <i>PHARMAChip</i> ®.....	138
2.2. Frecuencias de metabolizadores lentos para las principales enzimas metabolizadoras de fármacos de fase I y II.....	140
<b>3. UTILIDAD DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA PREDICCIÓN DE LA</b>	
<b>RESPUESTA A RISPERIDONA .....</b>	<b>143</b>
3.1. Estudio farmacogenético de seguridad de risperidona.....	145
3.2. Estudio farmacogenético de eficacia de risperidona.....	149

3.3. Limitaciones del estudio.....	151
<b>4. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL CON LA ESQUIZOFRENIA .....</b>	<b>156</b>
4.1. Estudio de asociación caso-control con la esquizofrenia y los haplotipos del promotor del gen <i>IL-10</i> .....	156
4.2. Estudio de asociación caso-control con la esquizofrenia y las variantes genéticas incluidas en <i>PHARMAChip</i> ®.....	161
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>197</b>
ANEXO 1. Escala PANSS.....	197
ANEXO 2. Escala UKU .....	199
ANEXO 3. Tratamientos concomitantes al tratamiento con risperidona .....	201
ANEXO 4. Frecuencias alélicas de las variantes genéticas incluidas en <i>PHARMAChip</i> ® en los pacientes.....	203
ANEXO 5. Frecuencias genotípicas de las variantes genéticas incluidas en <i>PHARMAChip</i> ® en los pacientes.....	205
ANEXO 6. Resultados del estudio de asociación caso-control con la esquizofrenia .....	207
ANEXO 6. Artículos científicos resultado de esta tesis.....	209



*Índice de ecuaciones,  
figuras, gráficos y tablas*

## **ECUACIONES**

### **Material y Métodos**

**Ecuación E1.** Cálculo de frecuencias alélicas

**Ecuación E2.** Cálculo de frecuencias genotípicas

**Ecuación E3.** Ecuaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg

**Ecuación E4.** Ecuación empleada para el cálculo de la sensibilidad

**Ecuación E5.** Ecuación empleada para el cálculo de la especificidad

**Ecuación E6.** Ecuación empleada para calcular la precisión

**Ecuación E7.** Ecuación empleada para el cálculo de cambio porcentual en la escala PANSS

## **FIGURAS**

### **Material y Métodos**

**Figura M1.** Desarrollo del estudio farmacogenético

### **Introducción**

**Figura I1.** Procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos

**Figura I2.** Margen terapéutico

**Figura I3.** Potencial clínico de la farmacogenética

**Figura I4.** Contribución de la esquizofrenia a la carga global de enfermedad según las estimaciones de la OMS

**Figura I5.** Diferentes diagnósticos psiquiátricos basados en las cinco principales dimensiones de la psicopatología

**Figura I6.** Diagnóstico de esquizofrenia según DSM-IV

**Figura I7.** Factores de riesgo de esquizofrenia con OR bien establecido



**Figura I8.** Riesgo de desarrollar esquizofrenia en familiares de primer grado de un paciente con la enfermedad.

**Figura I9.** Vías dopaminérgicas cerebrales

**Figura I10.** Estructura molecular de la risperidona

**Figura I11.** Asociación genotipo-fenotipo para los polimorfismos de CYP2D6

### **Discusión**

**Figura D1.** Porcentaje de fármacos comercializados que incluye información farmacogenética en relación con los genes implicados en el metabolismo de fase I y II estudiados

**Figura D2.** Modelo propuesto por Meyer y colaboradores de la modulación del cerebro y el comportamiento en el adulto por un desequilibrio de citoquinas en el cerebro fetal

**Figura D3.** Red molecular de la esquizofrenia desarrollada por Sun y colaboradores

## **GRÁFICOS**

### **Resultados**

**Gráfico R1.** Frecuencia de pacientes en tratamiento con cada forma farmacéutica de risperidona

**Gráfico R2.** Representación gráfica de la distribución de los datos de cambio de la escala PANSS

**Gráfico R2a.** Histograma de datos de cambio porcentual en la escala PANSS-T

**Gráfico R2b.** Histograma de datos de cambio porcentual en la escala PANSS-N

**Gráfico R2c.** Histograma de datos de cambio porcentual en la escala PANSS-P

**Gráfico R3.** Distribución de sexos entre casos y controles

**Gráficos R4 y R5.** Frecuencias alélicas (R4) y genotípicas (R5) de la variante -1082G>A de *IL-10* entre casos y controles

**Gráficos R6 y R7.** Frecuencias alélicas (R6) y genotípicas (R7) de la variante -1082G>A de *IL-10* entre casos y controles en la población de mujeres

**Gráfico R8.** Frecuencias genotípicas de los haplotipos del promotor de *IL-10* entre casos y controles en mujeres

## **TABLAS**

### **Introducción**

**Tabla I1.** Tasa de eficacia de los principales grupos terapéuticos

**Tabla I2.** Fármacos para los cuales existen marcadores farmacogenéticos eficaces en la predicción de la respuesta

**Tabla I3.** Algunos de los genes candidatos asociados a esquizofrenia

**Tabla I4.** Clasificación de los fármacos antipsicóticos

**Tabla I5.** Afinidad de los antipsicóticos por los diferentes receptores

**Tabla I6.** Propiedades de los fármacos antipsicóticos según la eficacia y efectos adversos

### **Material y métodos**

**Tabla M1.** Variantes genéticas incluidas en *PHARMAChip*®

**Tabla M2.** Variantes genéticas no incluidas en *PHARMAChip*®

**Tabla M3.** Condiciones de genotipado del VNTR de *SLC6A4*

**Tabla M4.** Sondas empleadas en la discriminación alélica

**Tabla M5.** Condiciones de la discriminación alélica

**Tabla M6.** Cebadores empleados en la PCR y secuenciación las variantes no incluidas en *PHARMAChip®*

**Tabla M7.** Condiciones de las PCRs realizadas en este trabajo

**Tabla M8.** Condiciones de la reacción de secuenciación

**Tabla M9.** Funcionalidad de los alelos de los genes *CYP2C19* y *CYP2C9*

**Tabla M10.** Puntuación propuesta para cada alelo del *CYP2D6* para la asignación de la actividad resultante de la enzima

**Tabla M11.** Funcionalidad de los alelos del gen *NAT2*

**Tabla M12.** Funcionalidad de los alelos del gen *TPMT*

**Tabla M13.** Variantes genéticas seleccionadas para el estudio farmacogenético

**Tabla M14.** Variantes genéticas seleccionadas para el estudio de asociación con la esquizofrenia

## **Resultados**

**Tabla R1.** Frecuencia de pacientes según las distintas categorías de las variables demográficas y clínicas

**Tabla R2.** Frecuencia de pacientes con tratamientos concomitantes según el grupo farmacológico

**Tabla R3.** Frecuencia de los efectos adversos según las categorías de la escala UKU

**Tabla R4.** Efectos adversos con frecuencia  $\geq 10\%$

**Tabla R5.** Media, desviación estándar y rango de los valores de cambio en las escalas PANSS-N, PANSS-P y PANSS-T

**Tabla R6.** Distribución de pacientes respondedores y no respondedores de las escalas PANSS negativa y positiva

**Tabla R7.** Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes no incluidas en *PHARMAChip*®

**Tabla R8.** Genes para los cuales no se obtuvo el total de los genotipos

**Tabla R9.** Sensibilidad y especificidad de *PHARMAChip*® para *CYP2D6* y *SLC6A4*

**Tabla R10.** Características analíticas determinadas en *PHARMAChip*®

**Tabla R11.** Frecuencias alélicas en la población control española. Comparación con la población de referencia

**Tabla R12.** Frecuencias genotípicas en la población control española. Comparación con la población de referencia

**Tabla R13.** Estudio de asociación genética con efectos adversos. Variantes genéticas asociadas

**Tabla R14.** Estudio de asociación genética con efectos adversos. Variantes genéticas significativas tras ajustar por las variables de confusión

**Tabla R15.** Cambio porcentual en la escala PANSS-T tras el tratamiento: Variantes genéticas asociadas

**Tabla R16.** Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles de los polimorfismos del promotor de *IL-10* y los haplotipos que forman

**Tabla R17.** Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del promotor de *IL-10* y los haplotipos que forman entre casos y controles estratificados por sexo

**Tabla R18.** Comparación de proporciones de los distintos genotipos en las mujeres sanas y esquizofrénicas

**Tabla R19.** Comparación de proporciones entre las mujeres portadoras de 2, 1 o ningún alelo ATA entre casos y controles

**Tabla R20.** OR proporcionado por el alelo ATA en homocigosis frente al alelo en heterocigosis o a la ausencia de ATA, para el desarrollo de esquizofrenia

## **Discusión**

**Tabla D1.** Fenotipos posibles en *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2D6*, variaciones genéticas responsables y consecuencias clínicas del fenotipo

**Tabla D2.** Fármacos para los cuales existe un biomarcador recomendado por la FDA

**Tabla D3.** Genes más investigados en relación con la respuesta a risperidona y variables estudiadas

## *Abreviaturas*

**AC:** Anticolinérgicos

**AD:** Antidepresivos

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**APA:** Antipsicóticos atípicos

**APC:** Antipsicóticos clásicos

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**BDZ:** Benzodiazepinas

**CEU (HapMap):** *Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH Collection* (Población de HapMap constituida por residentes de Utah con origen ancestral del Norte y Oeste de Europa).

**CNV:** *Copy number variation* (variación en el número de copias)

**COMT:** Catecol-o-metil transferasa

**CSP:** Cantidad suficiente para

**CYP:** Citocromo P-450

**CYP2C19:** Citocromo P-450 2C19

**CYP2C9:** Citocromo P-450 2C9

**CYP2D6:** Citocromo P-450 2D6

**CYP3A4:** Citocromo P-450 3A4

**D:** Dosis

**DALY:** *Disability Adjusted Life Years* (años de vida ajustados por discapacidad)

**DSM-IV:** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales)

**DRD2:** Receptores de dopamina D2

**DRD3:** Receptores de dopamina D3

**DRD4:** Receptores de dopamina D4

**E:** Especificidad

**EHV:** Equilibrio de Hardy-Weinberg

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FJD:** Fundación Jiménez Díaz

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico

**GST:** Glutation-S-transferasa

**GWAS:** *Genome Wide Association Studies* (estudios de asociación de todo el genoma)

**HUE:** Hospital Universitario de Extremadura

**HULP:** Hospital Universitario de La Princesa

**IC95%:** Intervalo de confianza del 95%.

**ICD:** *International Classification of Diseases* (Clasificación Internacional de las Enfermedades)

**IL-1B:** Interleuquina 1B

**IL-6:** Interleuquina 6

**IL-10:** Interleuquina 10

**MAF:** *Minimum allele frequency* (frecuencia alélica mínima)

**mg:** miligramo

**MCE:** Máxima concentración eficaz

**MCT:** Mínima concentración tóxica

**MI:** Metabolizador intermedio

**ML:** Metabolizador lento

**MN:** Metabolizador normal

**MU:** Metabolizador ultra rápido

**NAT:** N-Acetil transferasa

**NMDA:** N-metil D-Aspartato

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** *Odds Ratio*



**PANSS:** *Positive and Negative Symptom Scale* (Escala de los síndromes positivo y negativo)

**PANSS-N:** Escala PANSS negativa

**PANSS-P:** Escala PANSS positiva

**PANSS-T:** Escala PANSS total

**pb:** Pares de bases

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**S:** Sensibilidad

**SD:** Desviación estándar

**SEP:** Síntomas extrapiramidales

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de nucleótido único)

**SZGR:** SchiZophrenia Gene Resource

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TPMT:** Tiopurina metiltransferasa

**TSI:** Tuscans in Italy (población de Toscanos en Italia de HapMap)

**UGT:** UDP glucuronosil transferasa

**UKU:** *Udvalg for Kliniske Undersogelser* (Escala de efectos secundarios UKU)

**VNTR:** Variable number tandem repeat (número variable de repeticiones en tándem)

**Wt:** *Wild type* (sivestre)

**YLD:** *Years Lived with Disability* (años vividos con discapacidad)

**$\mu$ g:** microgramo

**$\mu$ L:** microlitro

**$\chi^2$ :** Test chi cuadrado de Pearson

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina)



*Resumen*

Hace más de 50 años que se sabe que parte de la variabilidad interindividual a los fármacos está determinada genéticamente. Desde que Vogel utilizara por primera vez el término farmacogenética hasta la actualidad, el conocimiento en esta disciplina ha incrementado exponencialmente, gracias al crecimiento en paralelo de las técnicas de genotipado y secuenciación y a la reducción de sus costes y de los tiempos de espera. La farmacogenética tiene potencial utilidad en la predicción de la respuesta a risperidona en el tratamiento de la esquizofrenia, con la que se produce una tasa de abandono de aproximadamente el 74% de los pacientes. Desafortunadamente, a pesar del gran avance en la investigación farmacogenética, aún no existe un marcador de respuesta definitivo y por tanto tampoco suficiente evidencia de un beneficio inequívoco, en términos de utilidad clínica, en la implantación de la farmacogenética en el campo de la psiquiatría.

Así, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la capacidad de variantes genéticas potencialmente implicadas en el mecanismo de acción de risperidona en la predicción de la respuesta y aparición de efectos adversos a este fármaco en 127 pacientes con un episodio agudo de esquizofrenia. Tras considerar los posibles factores de confusión clínicos, se encontraron las variantes genéticas en *ADRB2*, *CYP2D6*, *DRD2*, *DRD3*, *GRIN2B*, *HTR2A*, *MDR1* y *SLC6A4* asociadas a la aparición de los efectos adversos más frecuentes en los pacientes, según la escala UKU (frecuencia  $\geq 10\%$ ) y el fenotipo metabolizador lento de *CYP2D6* a una mejor respuesta al tratamiento con risperidona, medida como cambio en la escala PANSS. No obstante, estos resultados deben ser confirmados en muestras independientes que proporcionen una mayor potencia estadística.

La mayoría de las variantes genéticas asociadas a respuesta se encontraban en el chip de genotipado *PHARMAChip*®, para el cual se determinaron sus características analíticas con el objetivo de evaluar su posible utilidad en la práctica clínica. Los resultados de sensibilidad, especificidad, precisión y tasa de genotipado fueron muy altos, lo que hace de *PHARMAChip*® una herramienta adecuada para el genotipado farmacogenético desde el punto de vista analítico. No obstante, su diseño poco específico, con variantes genéticas implicadas en la respuesta a una miscelánea de fármacos, encarece el genotipado por ser la información aportada por *PHARMAChip*® excesiva ya que para la mayoría de las variantes incluidas en este chip su utilidad clínica aún no ha sido establecida.

Además, para todas las variantes genéticas incluidas en el mismo, se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas en 437 controles españoles y las frecuencias de metabolizadores lentos para CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, NAT2 y TPMT y de metabolizadores ultra rápidos de CYP2D6. Los resultados encontrados fueron, en la mayoría de los casos, similares a las frecuencias reportadas en la literatura. No obstante se encontraron diferencias intra-étnicas en *ADRB2*, *CYP1A2*, *CYP2D6*, *GSTP1*, *IL-10*, *MDR1*, *NAT2*, *TNF $\alpha$*  y *UGT1A1*. Estas diferencias encontradas apoyan la necesidad de establecer las frecuencias alélicas y genotípicas reales en cada población caucásica, incluida la española, para realizar una selección de poblaciones control adecuada para los estudios farmacogenéticos y evitar sesgos de estratificación.

Por último, al incluir *PHARMAChip*® entre sus variantes genéticas, algunas de las previamente asociadas al desarrollo de esquizofrenia, se realizó un estudio de asociación con la esquizofrenia en el que se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de estas variantes, seleccionadas apoyándose en lo descrito en la base de datos *Schizophrenia Gene Resource*, entre 245 casos y 437 controles, evaluando el sexo como factor de riesgo de la enfermedad. El resultado del estudio fue que se encontró una incidencia significativamente mayor del genotipo ATA/ATA en mujeres esquizofrénicas, siendo el alelo ATA el haplotipo formado por los SNPs localizados en las posiciones -1082, -819 y -592 del promotor del gen *IL-10*. Este genotipo confirió a las mujeres un riesgo de 4 a 6 veces mayor de desarrollar esquizofrenia que las heterocigotas o no portadoras de este alelo. La interleucina 10, pertenece al sistema inmune, el cual se ha asociado en múltiples ocasiones a esquizofrenia, sin embargo, el papel del mismo en la esquizofrenia debe ser esclarecido ya que aún no existe un marcador genético de susceptibilidad a esquizofrenia confirmado. Además la falta de replicación de los resultados en el resto de las variantes investigadas apoya la naturaleza poligénica de la esquizofrenia en la que múltiples vías biológicas pueden encontrarse alteradas. Así, estudios de asociación basados en SNPs en genes que participan en vías biológicas plausiblemente implicadas en la esquizofrenia, seleccionando sujetos según los denominados endofenotipos, más cercanos a la alteración genética de la esquizofrenia, podrían ser estudios más apropiados para la búsqueda de marcadores genéticos de susceptibilidad a la enfermedad.

# *Introducción*

## **1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA A LOS FÁRMACOS Y FARMACOGENÉTICA**

No todos los pacientes responden de igual manera a los fármacos. La administración de la misma dosis de un determinado fármaco en pacientes con igual patología pueden producir respuestas diferentes en los individuos. Mientras que en la mayoría de los pacientes se observan los efectos terapéuticos deseados, en otros puede obtenerse una menor respuesta, o incluso ninguna, y además, ciertos individuos experimentan efectos adversos derivados del tratamiento, que pueden ser desde leves a graves, o incluso comprometer la vida del paciente (Liebler & Guengerich, 2005).

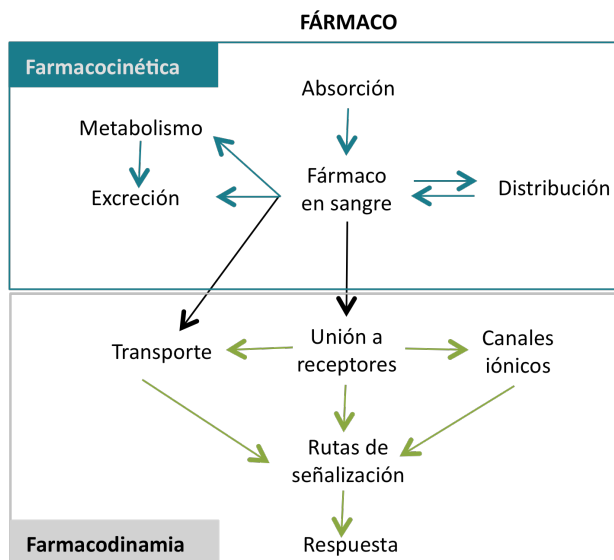
### **1.1. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA A LOS FÁRMACOS. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA**

La respuesta a los fármacos es multifactorial y en ella intervienen factores propios de la enfermedad y de su diagnóstico, la presencia de enfermedades concomitantes o factores del tratamiento, como son las dosis o la administración simultánea de otros fármacos que pueden producir interacciones medicamentosas. Además, participan factores ambientales y de estilo de vida, como los hábitos dietéticos, el consumo de alcohol o de tabaco y, por último, factores idiosincrásicos específicos de cada individuo, condicionados genéticamente (Liebler & Guengerich, 2005).

El reconocimiento de que parte de dicha variabilidad interindividual está determinada genéticamente dio lugar a la creación del campo de la farmacogenética, disciplina que estudia las bases genéticas de la respuesta a los fármacos, hace más de cincuenta años (Revisado en Meyer, 2004)).

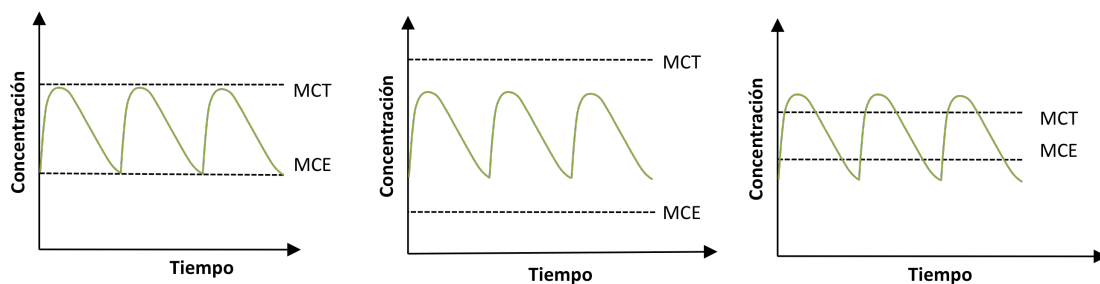
La manera en la que influyen los factores anteriormente mencionados en la respuesta terapéutica es modificando los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos. Los primeros son aquellos que determinan la cantidad de fármaco que llega al lugar donde ejerce su acción farmacológica, a partir de su administración (Flórez, Armijo, & Mediavilla, 2003), y son liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (*Figura II*).

Por otro lado, los procesos farmacodinámicos son aquellos efectos que ejerce un fármaco en el organismo como resultado de interacciones moleculares con receptores específicos o enzimas (Flórez et al., 2003) (*Figura 11*).



**Figura 11.**  
*Procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos*

Además, dicha influencia depende en gran medida del margen terapéutico del fármaco, que se define como el ámbito de concentraciones de un fármaco dentro del cual existe una probabilidad elevada de conseguir eficacia (mínima concentración eficaz -MCE-) con la mínima toxicidad (mínima concentración tóxica -MCT-) en la mayoría de pacientes (Flórez et al., 2003) (*Figura 12*).



**Figura 12.** *Margen terapéutico. De izquierda a derecha: representación gráfica del margen terapéutico; fármacos con margen terapéutico ancho y estrecho*



Por lo tanto, en aquellos fármacos que tengan un estrecho margen terapéutico las consecuencias de la modificación de los factores farmacocinéticos y farmacodinámicos será más importante que en los fármacos con un amplio margen.

## 1.2. FACTORES GENÉTICOS DE VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL

Se sabe que la variación en el genoma contribuye de manera significativa a las diferencias fisiológicas encontradas entre individuos y, por lo tanto, puede suponer una respuesta a los fármacos variable (National Human Genome Research Institute).

A comienzos de 2010 se dieron a conocer los primeros resultados del Proyecto de los 1.000 Genomas (Durbin et al., 2010), una iniciativa internacional cuyo fin es generar una base de datos pública sobre la variación genética humana (1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation). Estos resultados preliminares han puesto en evidencia la existencia de más de 16 millones de variantes genéticas a lo largo de todo el genoma, que se presentan con diferente frecuencia en la población y que tienen diversas consecuencias funcionales, desde inocuas o beneficiosas hasta altamente deletéreas (Durbin et al., 2010).

Según la frecuencia de las variantes genéticas, se denominan variantes comunes a aquellas con una frecuencia alélica mínima (*MAF*) en la población del 5%; variantes de baja frecuencia aquellas con una  $MAF=0,5-5\%$  y las consideradas raras con una  $MAF \leq 0,5\%$  (Durbin et al., 2010).

### 1.2.1. Tipos de variación genética

Existen diversos tipos de variantes genéticas en función de su naturaleza.

#### 1.2.1.1. Polimorfismos de nucleótido simple (*Single nucleotide polymorphism, SNP*)

Se han descrito más de 15 millones a lo largo del genoma (Durbin et al., 2010) y se producen por el cambio de un solo nucleótido, lo que generalmente da lugar a dos alelos, el silvestre (*wild type-wt-*) y el mutado. De este modo, según el tipo de cambio que el SNP genere en la secuencia aminoacídica, estos pueden ser (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2007):

Si se producen en **regiones codificantes**:

- SNPs sinónimos (*synonymous SNPs*): aquellos en los que el cambio nucleotídico no cambia la secuencia de aminoácidos, por traducirse en el mismo aminoácido que la secuencia original.
- SNPs con cambio de sentido (*missense SNPs*): El cambio nucleotídico se traduce en un aminoácido distinto al de la secuencia original.
- SNPs sin sentido (*nonsense SNPs*): El cambio nucleotídico genera un codón de parada prematura y resulta en una proteína truncada.

El ya citado Proyecto de los 1.000 Genomas revela que existen un promedio de 10.000-11.000 variantes no sinónimas y 12.000 sinónimas de diferencia entre el genoma de un individuo y la secuencia de referencia del genoma humano (Durbin et al., 2010).

Por otro lado, si el SNP se produce en **regiones no codificantes** puede ocurrir que se altere el proceso de corte y empalme del ARN mensajero (*splice-site disrupting SNPs*) o que el cambio resulte silencioso.

#### ***1.2.1.2. Inserciones y deleciones de 1 a 100 pares de bases (indels)***

Según el tamaño de ADN implicado se clasifican en (Nussbaum et al., 2007):

- Simples: de 1 a 3 bases. Son funcionales aquellas *indels* que alteran el marco normal de lectura de la proteína y producen un codón de parada prematura (*frameshift indel*)
- Repeticiones en tándem (*VNTRs -Variable Number of Tandem Repeats-*). Son multialélicos y en función del tamaño del fragmento repetido se clasifican en:
  - Microsatélites (STRs-*Short Tandem Repeats-*): 2-12 repeticiones en tándem de 2-5 nucleótidos.
  - Minisatélites: Repeticiones de 6 a 25 nucleótidos.
  - Satélites: Unidades de repetición más largas (de 100 a 1000 pares de bases).

#### ***1.2.1.3. Variaciones en el número de copias (CNV- Copy Number Variation-)***

Son segmentos de ADN mayores de 1kb de tamaño y se presentan en el genoma en número variable entre individuos. Se estima que existen alrededor de 20.000 variaciones

de este tipo en el genoma humano (Durbin et al., 2010) y pueden producir ganancia o pérdida de material genético (Feuk, Carson, & Scherer, 2006). Esto puede resultar en un incremento o una pérdida en la actividad de la proteína que codifican si el CNV implica regiones codificantes del genoma, lo que se ha demostrado funcionalmente los genes *CYP2D6* (Lovlie, Daly, Molven, Idle, & Steen, 1996), *GSTM1* (Seidegard, Vorachek, Pero, & Pearson, 1988) o *GSTT1* (Pemble et al., 1994), implicados en procesos farmacocinéticos.

### 1.2.2. SNPs comunes y Proyecto Internacional HapMap

Con gran diferencia, los SNPs son las variaciones más abundantes en el genoma humano, con una media de 1 por cada 300 pares de bases (Feuk et al., 2006). Ello supone un 90% del total de las variantes genéticas y también las más estudiadas en farmacogenética.

Se ha observado que aquellos SNPs comunes cercanos en el genoma tienden a estar estrechamente correlacionados entre sí por existir un alto desequilibrio de ligamiento entre ellos y, por lo tanto, se organizan en un número discreto de bloques haplotípicos, los cuales varían entre poblaciones (revisado en Stranger, Stahl, & Raj, 2010).

Con el objetivo de establecer los patrones de variación genética común en las diferentes poblaciones surgió en 2003 el Proyecto Internacional HapMap (International HapMap Consortium, 2003), mediante el cual se han caracterizado en la actualidad más de 4 millones de SNPs comunes en 270 individuos de origen africano, asiático y europeo y 1,6 millones de SNPs en siete poblaciones adicionales (revisado en Stranger et al., 2010).

El fin último del Proyecto Internacional HapMap es *mapear* los SNPs de todo el genoma y caracterizarlos en todas las poblaciones y, en consecuencia, favorecer la búsqueda de genes implicados en la salud, la enfermedad y la respuesta a fármacos y agentes medioambientales (International HapMap Consortium, 2003).

## **2. LA FARMACOGENÉTICA**

Como ya se ha mencionado anteriormente, la farmacogenética es la disciplina que estudia las variaciones en la secuencia del ADN en relación con la respuesta terapéutica. Este concepto se diferencia de uno más amplio, el de la farmacogenómica, que estudia las características de las variaciones del ADN y el ARN en relación con la respuesta a los fármacos. Ambas definiciones han sido consensuadas recientemente por la ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, 2006).

Desde que Vogel utilizara por primera vez este término en 1959, la investigación en farmacogenética está experimentando una gran revolución (Meyer, 2004). Esto se ha visto favorecido por los avances en las técnicas de genotipado y secuenciación de alto rendimiento. Esto ha traído consigo una disminución en los costes, la disponibilidad de una amplia información genética, como consecuencia de la secuenciación completa del genoma humano, y el desarrollo de nuevas aproximaciones estadísticas y genéticas para el análisis de los datos generados y la detección de las asociaciones con la respuesta terapéutica (Roses, 2004).

### **2.1. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA FARMACOGENÉTICA**

Actualmente existen dos aproximaciones para el manejo terapéutico de las enfermedades (Johnson, 2003). La primera es la identificación del fármaco más adecuado para el tratamiento de una determinada patología mediante el método denominado 'ensayo-error'. Esta aproximación terapéutica es frecuentemente utilizada en enfermedades como la hipertensión, la diabetes y la esquizofrenia. Para todas ellas existen varios fármacos considerados como primera línea de tratamiento y hasta encontrar el más efectivo se prueban muchos, lo que retrasa el control de los síntomas de la enfermedad (Johnson, 2003). La segunda aproximación es la elección del tratamiento mediante protocolos establecidos, de manera que el tratamiento es esencialmente el mismo para todos los pacientes con el mismo diagnóstico. Es frecuente este tipo de actuación en enfermedades como el cáncer, la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio (Johnson, 2003).

Área terapéutica	Tasa de eficacia
Alzheimer	30%
Analgésicos (COX-2)	80%
Arritmias cardíacas	60%
Artritis reumatoide	50%
Asma	60%
Depresión (IRS)	62%
Diabetes	57%
Esquizofrenia	60%
Hepatitis C	47%
Incontinencia	40%
Migraña (aguda)	52%
Oncología	25%
Osteoporosis	48%

**Tabla II.**  
**Tasa de eficacia de los**  
**principales grupos**  
**terapéuticos. IRS:**  
**Inhibidores de la**  
**recaptación de serotonina.**  
**COX-2: Ciclooxygenasa 2.**  
**Adaptada de Spear,**  
**Heath-Chiozzi, & Huff,**  
**2001**

De cualquier manera, en ambos casos, existe un porcentaje de pacientes que no se beneficia de los tratamientos administrados, por no ser eficaces o por experimentar reacciones adversas en diversos grados.

Se ha estimado que para la mayoría de los fármacos la tasa de eficacia no supera el 80% (Spear et al., 2001) llegando a cifras tan bajas como el 25% en el caso de los quimioterápicos (*tabla II*).

Además, existen numerosos estudios que destacan las consecuencias económicas y médicas que tienen las reacciones adversas derivadas de los tratamientos farmacológicos (Hosford et al., 2004). Las reacciones adversas a medicamentos son una causa importante de morbilidad y mortalidad (Schenkel, 2000), con una incidencia en países como Estados Unidos de más de dos millones de casos y más de 100.000 muertes al año (Lazarou, Pomeranz, & Corey, 1998). Asimismo, las reacciones adversas graves no solo suponen aproximadamente el 7% de todas las hospitalizaciones anuales sino que aumentan el tiempo de hospitalización, lo que tiene consecuencias médicas y económicas importantes incluso a pesar de que los pacientes no acaben hospitalizándose (Haramburu, Pouyanne, Imbs, Blayac, & Begaud, 2000).

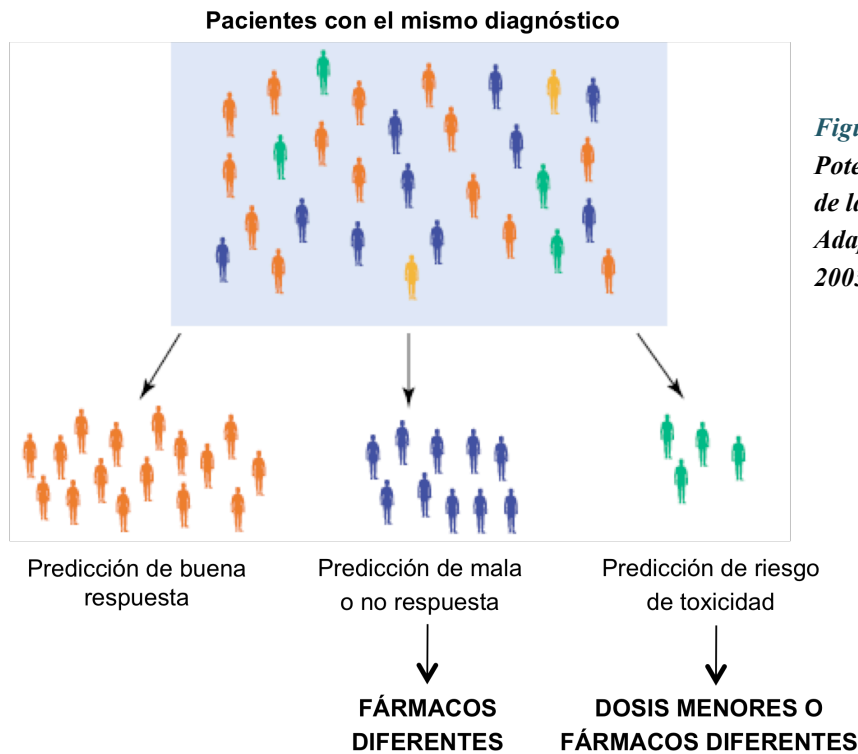
En España, en una revisión realizada por Puche Cañas y de Dios Luna (Puche Cañas & de Luna J, 2006) de los estudios epidemiológicos realizados sobre reacciones adversas a

medicamentos entre los años 1974 y 2004, se encontró una incidencia del 3%, entre los casi 140.000 pacientes incluidos, siendo reacciones adversas graves el 17% y el 0,6% fatales. En cuanto a la mortalidad debida a reacciones adversas a medicamentos, ésta se halla entre el 0,05% y el 5%, lo que la sitúa entre la quinta y sexta causa global de muerte (Lazarou et al., 1998). Estos autores también destacan los antibacterianos, antiinflamatorios no esteroideos y psicofármacos como los principales fármacos asociados a estos efectos adversos (Puche Cañas & de Luna J, 2006). Por otro lado, Carrasco-Garrido y colaboradores evidenciaron que aproximadamente el 1,7% de las hospitalizaciones son debidas a reacciones adversas a medicamentos, de las cuales el 5% son fatales y con unas consecuencias económicas anuales cercanas a los 300 millones de euros (Carrasco-Garrido, de Andres, Barrera, de Miguel, & Jimenez-Garcia, 2010).

En consecuencia, en muchas ocasiones el coste derivado de la falta de eficacia y de las reacciones adversas supera el coste propio del tratamiento (Lazarou et al., 1998).

De todo lo anterior se deduce que aquellos fármacos con una gran variabilidad interindividual, un estrecho margen terapéutico o cuya falta de respuesta terapéutica tenga como consecuencia un problema clínico importante (Daly, 2010) constituyen el objetivo principal de la farmacogenética.

En esos casos, esta disciplina se presenta como una herramienta con potencial capacidad de predecir la respuesta terapéutica e identificar a los pacientes con posibilidad de beneficiarse y a aquellos en riesgo de desarrollar reacciones adversas derivadas (*figura 13*) y, por tanto, establecer para ellos nuevas dosis o tratamientos alternativos, además de eliminar la aproximación terapéutica del 'ensayo-error'.



**Figura I3.**  
**Potencial clínico**  
**de la farmacogenética.**  
**Adaptado de Johnson,**  
**2003**

## 2.2. TIPOS DE ESTUDIOS EN FARMACOGENÉTICA

Como ya se ha expuesto anteriormente, la respuesta al tratamiento está, en parte, determinada genéticamente, y en la mayoría de los casos es el resultado de la interacción de varios genes, implicados en la farmacocinética y farmacodinamia, que contribuyen con un pequeño riesgo al riesgo global (Daly, 2010). En consecuencia, la mayoría de los estudios farmacogenéticos son estudios de tipo caso-control, en los cuales se estudia la asociación entre la presencia de un efecto adverso o la respuesta a un determinado tratamiento con variantes funcionales en genes relacionados con la farmacocinética y farmacodinamia (Daly, 2010).

Entre los genes relacionados con la farmacocinética, los más estudiados han sido los implicados en el metabolismo de fármacos.

Existen dos tipos de metabolismo de fármacos y de enzimas metabolizadoras: el metabolismo de fase I, cuyo principal representante es la superfamilia del citocromo P-450, y que catalizan reacciones de oxidación; y el metabolismo de fase II, que comprende reacciones de conjugación catalizadas por enzimas como la N-Acetil

transferasa (NAT), la Glutathione-S-transferasa (GST), la Uridin difosfato glucucosil transferasa (UGT) o la Tiopurin-S-metil transferasa (TPMT), cuyo fin es la generación de compuestos fácilmente eliminables (Flórez et al., 2003).

En relación con la farmacogenética, los genes más estudiados son *CYP2C19*, *CYP2C9* o *CYP2D6* (Zhou et al., 2008), miembros de la familia del citocromo P-450, y los que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos de fase II, *NAT2*, *UGT1A1* o *TPMT* (Zhou et al., 2008). Además, otros genes ampliamente estudiados son aquellos implicados en el transporte de los fármacos, como *MDR1*, y en la farmacodinamia de una gran variedad de fármacos, como receptores y transportadores dopaminérgicos y serotoninérgicos (diana de fármacos antipsicóticos o antidepresivos, entre otros),  $\beta$ -adrenérgicos (importantes en la respuesta a los fármacos  $\beta$ -bloqueantes o antiasmáticos) o enzimas como *VKORC1*, diana de los anticoagulantes orales cumarínicos (Zhou et al., 2008).

Por otro lado, y gracias a la reducción en los costes de genotipado, existe otra estrategia en los estudios farmacogenéticos, que consiste en el estudio de cientos de miles de SNPs a lo largo de todo el genoma, en lugar de un número limitado de ellos (GWAS-Genome Wide Association Studies-). No obstante, estos estudios estarían incluidos dentro del campo de la farmacogenómica en vez de farmacogenética.

Los *GWAS*, en los cuales no se parte de una hipótesis causal previa, poseen una gran potencia en la identificación de posibles genes implicados en la respuesta terapéutica, que generalmente es poligénica y que no necesariamente implica los considerados genes candidatos obvios (Daly, 2010). Sin embargo, este tipo de estudios tienen una serie de limitaciones como el elevado número de individuos necesarios para encontrar un marcador genético significativamente asociado y la falta de replicación de muchos de ellos (Daly, 2010). En concreto, de los trece GWAS realizados en farmacogenómica hasta la fecha, siete de ellos no han encontrado ningún marcador asociado y en uno de ellos los resultados positivos encontrados no han sido replicados (revisado en Daly, 2010).



### 2.3. FARMACOGENÉTICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA ACTUAL

Las técnicas de genotipado han experimentado una revolución en los últimos años, con el desarrollo de tecnologías de alto rendimiento que permiten la caracterización de cientos de variantes genéticas en un individuo, en un tiempo y con unos costes cada vez menores (Fleeman et al., 2010). Esto ha favorecido el desarrollo de herramientas farmacogenéticas destinadas a la predicción de la respuesta terapéutica en la práctica clínica (Fleeman et al., 2010). Una de ellas, el *AmpliChip®* (Roche), fue aprobada en el año 2004 por la FDA (Food and Drug Administration) para el genotipado de *CYP2C19* y *CYP2D6* en la práctica clínica. Este organismo además, ha incorporado en la actualidad información relacionada con la farmacogenética en más de 200 fármacos en Estados Unidos y ha publicado una lista con marcadores farmacogenéticos de demostrada utilidad en la predicción de respuesta terapéutica a una variedad de fármacos (*tabla I2*) (FDA) para los cuales ha recomendado su determinación.

Fármaco	Marcador farmacogenético
Abacavir	<i>HLA-B*5701</i>
Antidepresivos tricíclicos	
Antipsicóticos clásicos	<i>CYP2D6</i>
Tamoxifeno	
Azatioprina	<i>TPMT</i>
6-Mercaptopurina	
Carbamazepina	<i>HLA-B*1502</i>
Cetuximab	Expresión de <i>EGFR</i> y <i>K-Ras</i>
Panitumumab	
Dasatinib	Cromosoma Ph1
Imatinib	(y expresión de <i>c-KIT</i> para imatinib)
Efavirenz	<i>CYP2B6*6</i>
Irinotecán	<i>UGT1A1*28</i>
Maraviroc	Expresión de <i>CCR5</i>
Fenitoína	<i>CYP2C9</i> (y <i>HLA-B*1502</i> en asiáticos)
Tacrolimus	<i>CYP3A4</i>
Trastuzumab	<i>HER2/Neu</i>
Warfarina	<i>CYP2C9/VKORC1</i>

**Tabla I2.**  
Fármacos para los cuales existen marcadores farmacogenéticos eficaces en la predicción de la respuesta. Adaptado de Gervasini et al., 2010

No obstante, y como puede observarse en la *tabla 12*, el uso de la farmacogenética en la práctica clínica hoy en día se limita a un número discreto de fármacos, debido a que la utilidad clínica para la mayoría de los marcadores farmacogenéticos identificados mediante las anteriores estrategias no está clara y sigue siendo objeto de numerosas investigaciones (Gervasini, Benitez, & Carrillo, 2010).

### **3. IMPORTANCIA DE LA FARMACOGENÉTICA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA**

La esquizofrenia es una enfermedad crónica e incapacitante cuyo tratamiento de elección son los fármacos antipsicóticos, que tienen un estrecho margen terapéutico (Florez et al., 2003). Como consecuencia, se estima que cerca de un 75% de pacientes abandonan el tratamiento en los 18 primeros meses (Lieberman et al., 2005) debido a la falta de eficacia (30%-50%) (Arranz & Kapur, 2008) (*tabla 11*) o a la aparición de efectos adversos graves (20-30%) (Nnadi & Malhotra, 2007), entre los que se incluyen anormalidades metabólicas, accidentes cardiovasculares o alteraciones del movimiento (Kapur & Remington, 2001).

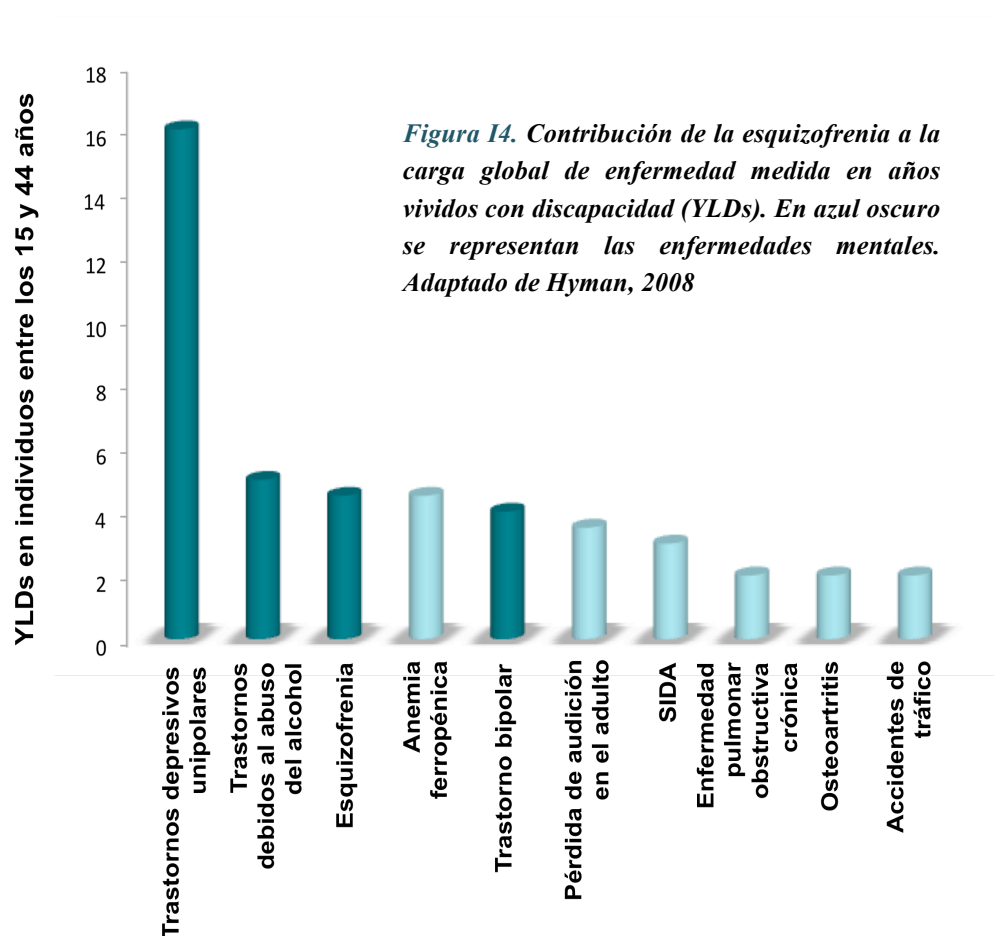
Debido a esto, la elección del tratamiento antipsicótico más adecuado para cada paciente, sigue la aproximación del 'ensayo-error', de manera que aquellos pacientes en los cuales estos tratamientos no son eficaces o desarrollan efectos adversos, se les prescriben otros antipsicóticos hasta encontrar el tratamiento más eficaz. Además, en la práctica clínica psiquiátrica, la respuesta al tratamiento se evalúa mediante el uso de variables clínicas (escalas), lo que no siempre se asocia a una respuesta óptima por no ser esta medida objetiva (Nnadi & Malhotra, 2007).

La consecuencia de todo lo anterior es que generalmente se produce un largo transcurso de tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad y el establecimiento de un tratamiento eficaz. Ello conlleva un aumento significativo en la morbi-mortalidad de los pacientes (Nnadi & Malhotra, 2007), de la tasa de suicidios (uno de los grandes problemas de la ineficacia del tratamiento), del coste sociolaboral y del número de ingresos hospitalarios (Carrasco-Garrido et al., 2010).

Por lo tanto, el tratamiento antipsicótico es uno de los principales objetivos en la investigación farmacogenética, que tiene en este campo, un enorme potencial para identificar, *a priori*, los pacientes 'respondedores' de los 'no respondedores' y administrar a cada uno de ellos, el tratamiento y las dosis más óptimas.

#### 4. LA ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica, grave e incapacitante que afecta alrededor del 1% de la población mundial (OMS- Organización Mundial de la Salud-, 1998). La incidencia y prevalencia de la enfermedad es de 15,2 por cada 100.000 personas-año (McGrath et al., 2004) y de 4 a 7 de cada 1000 personas-año (Saha, Chant, Welham, & McGrath, 2005), respectivamente. A pesar de que la incidencia es relativamente baja, se considera una de las patologías que más contribuye a la 'carga global de enfermedad'.



La OMS para medir esta 'carga global de enfermedad' ha creado un estimador denominado DALY, que son las siglas en ingles de 'años de vida ajustados por discapacidad'. Este estimador es la suma de los 'años de vida perdidos por muerte prematura' en una población y los 'años vividos con discapacidad' (YLDs) (OMS, 1998). En relación con las enfermedades psiquiátricas, la OMS en el año 2000 estimó que estas eran responsables del 12% del total de DALYs en todo el mundo y del 31% de los YLDs. En concreto, como puede observarse en la *figura 14* la esquizofrenia supuso un 1,1% de los DALYs totales y un 2,8% de los YLDs (OMS, 2001).

En parte, este hecho se debe al inicio temprano de la enfermedad, durante la adolescencia, y de la persistencia de los síntomas a lo largo de toda la vida en aproximadamente dos tercios de los pacientes, a pesar de estar diagnosticados y tratados adecuadamente (Saha et al., 2005). Las consecuencias que esto último tiene es que alrededor del 30% de los pacientes intentan el suicidio al menos una vez en su vida (Radomsky, Haas, Mann, & Sweeney, 1999) y un 10% de los pacientes mueren por esta causa (Caldwell & Gottesman, 1990).

No obstante, a pesar de la alta tasa de suicidio entre los pacientes esquizofrénicos, la mayoría de ellos muere como consecuencia de la falta de atención sanitaria adecuada o del aumento de los factores de riesgo de otras enfermedades como la obesidad, una dieta incorrecta o el consumo de alcohol y/o tabaco (Saha, Chant, & McGrath, 2007). Como resultado, los pacientes con esquizofrenia tienen de media de 12 a 15 años menos de esperanza de vida que el resto de la población (Saha et al., 2007).

#### **4.1. SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO DE LA ESQUIZOFRENIA**

La esquizofrenia es un síndrome caracterizado por su larga duración y presentar extraños delirios, síntomas negativos y con menos frecuencia depresión y manía (síntomas afectivos). La presentación clínica de la esquizofrenia varía ampliamente en los individuos afectados e incluso en un mismo individuo puede variar en las diferentes fases de la enfermedad (van Os & Kapur, 2009).

Los síntomas de la esquizofrenia se clasifican, de manera general, en (Freedman, 2003):

-Síntomas positivos: Considerados como un 'exceso' respecto de la función o conducta normal:

- Alucinaciones, generalmente auditivas
- Delirios
- Lenguaje y pensamientos desorganizados (síntoma más común de la esquizofrenia)
- Agitación
- Catatonia

-Síntomas negativos: Considerados como una 'pérdida' respecto de la conducta normal:

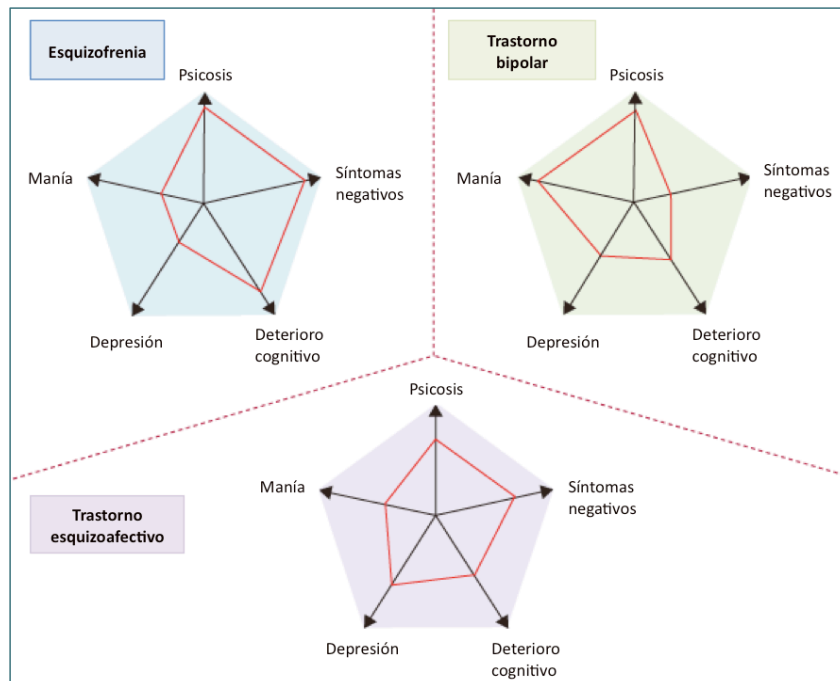
- Aplanamiento afectivo: expresión emocional limitada
- Anhedonia: dificultad para encontrar placer
- Abulia: falta de voluntad
- Alogia: dificultad en la integración del pensamiento y el lenguaje
- Atención deteriorada
- Retraimiento social
- Apatía

-Síntomas cognitivos: Como falta de atención o fallos de memoria

Estos síntomas no son exclusivos de la esquizofrenia, sino que son comunes a un abanico de trastornos psiquiátricos (*Figura 15*) y el criterio utilizado para distinguir entre los distintos trastornos psicóticos está basado en la duración, disfunción, tipo de alucinaciones y presencia de depresión o manía (van Os & Kapur, 2009).

Uno de los grandes problemas del diagnóstico de la esquizofrenia, es que no existen pruebas diagnósticas objetivas validadas para establecer los fenotipos precisos de la enfermedad. Además, las anormalidades biológicas encontradas en la enfermedad no son ni lo suficientemente sensibles, por no encontrarse en todos los pacientes, ni específicas, ya que se observan también en personas sanas, como para usarse como prueba diagnóstica (Allen, Griss, Folley, Hawkins, & Pearlson, 2009). Esto es por lo

que el diagnóstico actualmente se basa en la identificación y confirmación de los síntomas, signos y curso clínico de la enfermedad.



**Figura 15.**

*Diferentes diagnósticos psiquiátricos basados en las cinco principales dimensiones de la psicopatología. Las líneas rojas indican la puntuación cuantitativa. Tomado de van Os & Kapur, 2009*

Las herramientas más utilizadas para el diagnóstico de la esquizofrenia son los criterios clínicos del DSM-IV (siglas en inglés de Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales versión IV de la Asociación Americana de Psiquiatría) y el ICD en su versión 10 (siglas en inglés de Clasificación Internacional de las Enfermedades de la OMS). En concreto, el DSM-IV, contiene una clasificación de los trastornos mentales y proporciona descripciones claras de las categorías diagnósticas y en relación con la esquizofrenia, el diagnóstico se basa en la aparición y duración de los síntomas de la enfermedad y en alteraciones de la vida social y personal (*Figura 16*).

1. Aparición de dos o más de los síntomas característicos:
  - A. Alucinaciones
  - B. Comportamiento desorganizado
  - C. Delirios
  - D. Pensamiento desorganizado
  - E. Síntomas negativos
2. Persistencia de los síntomas al menos un mes y presentación continuada de alteraciones ligadas a la esquizofrenia durante un mínimo de seis meses.
3. Alteraciones en la actividad social y personal del paciente respecto al trabajo, relaciones sociales o cuidado personal.

**Figura I6. Diagnóstico de esquizofrenia según DSM-IV**

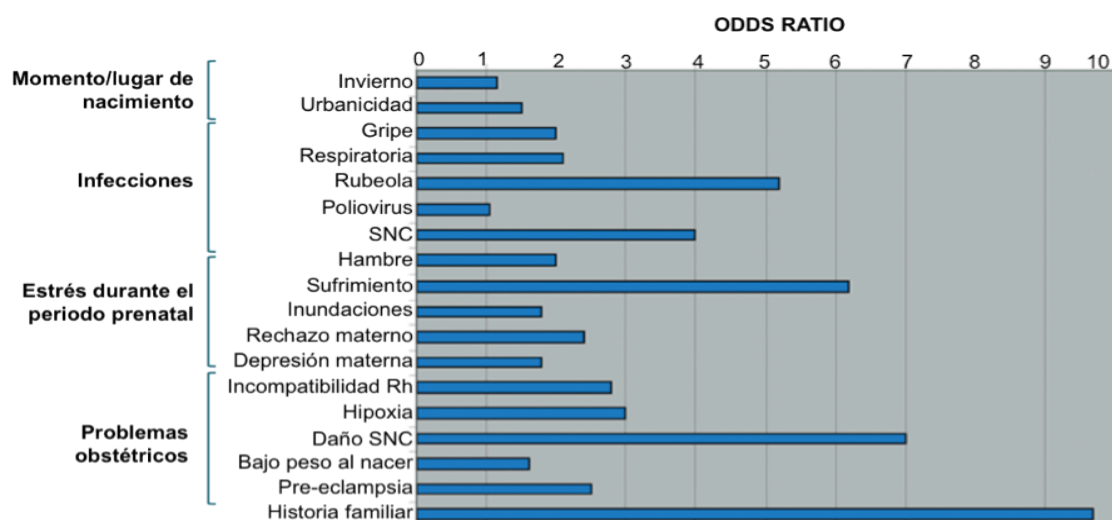
## 4.2. FACTORES DE RIESGO

La esquizofrenia se considera una enfermedad compleja, causada por la interacción de factores de riesgo ambientales y genéticos (Purcell et al., 2009).

### 4.2.1. Factores ambientales

Numerosas evidencias muestran que existen factores ambientales que afectan a la tasa de esquizofrenia y de otros trastornos relacionados. Así, se han identificado factores de riesgo biológicos y psicosociales, durante la fase pre y perinatal, la infancia y la edad adulta (Maki et al., 2005) (*Figura I7*).

En la fase prenatal, varios estudios epidemiológicos han asociado las infecciones maternas con un incremento en el riesgo de desarrollar esquizofrenia (revisado en (Brown & Derkits, 2010)). A pesar de no conocerse el mecanismo neurobiológico, la hipótesis propuesta es que existe una respuesta alterada del sistema inmune mediante la producción anormal de determinadas citoquinas (Brown & Derkits, 2010). También la hipoxia (Cannon, Jones, & Murray, 2002) o la malnutrición severa materna (Brown & Susser, 2008) (Brown, 2006) durante el desarrollo fetal suponen factores de riesgo responsables de una pequeña proporción en la incidencia de la esquizofrenia.



**Figura 17.** Factores de riesgo de esquizofrenia con OR bien establecido. SNC: Sistema nervioso central. Adaptado de Sullivan, 2005

Por otro lado, durante la adolescencia, el consumo de cannabis se considera uno de los factores de riesgo que más se ha asociado al desarrollo de esquizofrenia (Odds Ratio - OR=1,5-2,0) (Moore et al., 2007) (D'Souza, Sewell, & Ranganathan, 2009).

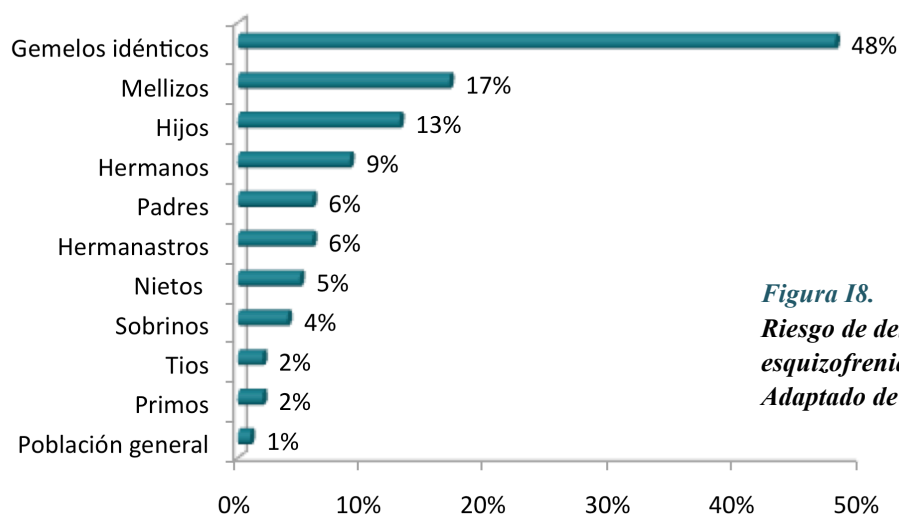
Existen además otros factores vinculados a desventajas sociales y aislamiento (Morgan et al., 2008), asociados a su vez a una mayor incidencia de esquizofrenia, como la 'urbanicidad' con un aumento del riesgo de esquizofrenia en el medio urbano comparado con el rural (Krabbendam & van Os, 2005) o la inmigración (Cantor-Graae & Selten, 2005), sobre todo si esta se da en áreas urbanas pequeñas o guetos (OR=2,0-5,0) (Veling et al., 2008).

#### 4.2.2. Factores genéticos

Se sabe que la esquizofrenia tiene un alto componente genético resultado de la interacción de varios genes, entre ellos y con los factores ambientales, que contribuyen con una pequeña proporción al riesgo global de la enfermedad (Purcell et al., 2009). Además, mediante estudios realizados en gemelos monocigóticos se ha estimado que la esquizofrenia tiene una heredabilidad de hasta el 80% (Sullivan, Kendler, & Neale, 2003), y que el riesgo de recurrencia de la enfermedad en familiares de primer grado de un individuo afectado es 9 veces mayor que en la población general (Hyman, 2008).



La *figura 87* muestra el riesgo de desarrollar esquizofrenia en los familiares de primer grado de un paciente con la enfermedad (Kirov, O'Donovan, & Owen, 2005).



**Figura I8.**  
**Riesgo de desarrollar**  
**esquizofrenia.**  
*Adaptado de Kirov et al., 2005*

Estas medidas de la influencia genética hacen que la esquizofrenia sea considerada una de las enfermedades complejas más heredables (Hyman, 2008) a la que se han asociado miles de variantes genéticas en cientos de genes (Allen et al., 2008). Desafortunadamente, estas asociaciones genéticas normalmente no se replican y por lo tanto, no existe en la actualidad ninguna variante genética ligada a la enfermedad de manera definitiva (Burmeister, McInnis, & Zollner, 2008).

Los genes que se han asociado a la esquizofrenia están relacionados con mecanismos neuroquímicos implicados en la enfermedad (Tiwari, Zai, Muller, & Kennedy, 2010) como la transmisión dopaminérgica (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3* o *DRD4*); serotoninérgica (*HTR2A* o *SLC6A4*); glutamatérgica (*GRIN2B*) o gabaérgica (*GABRB2*), entre otros (Allen et al., 2008). También se han asociado genes del sistema inmune (genes del sistema mayor de histocompatibilidad (Stefansson et al., 2009) y codificantes de diversas citoquinas (Allen et al., 2008), genes implicados en vías de señalización celular, neurodesarrollo, procesamiento de la información neurofisiológica, sinapsis o sensibilidad al estrés (Hyman, 2008) (*tabla I3*).

Gen	Localización	Función	Meta análisis
<i>AKT1</i>	14q22-32	Señalización celular	-
<i>APOE</i>	19q13.2	Sinapsis	+
<i>COMT</i>	22q11	Metabolismo de catecolaminas	++
<i>DAOA</i>	13q32-34	Metabolismo D-Ser	++
<i>DISC1</i>	1q42	Neurodesarrollo y función sináptica	+++
<i>DRD2</i>	11q23	Transmisión dopaminérgica	++
<i>DTNBP1</i>	6p22	Neurodesarrollo y sinapsis	+++++
<i>ERBB4</i>	2q33.3-q34	Receptor tirosina kinasa NRG1	ND
<i>GABRB2</i>	5q34	Transmisión GABAérgica	++++
<i>GRIN2B</i>	12p12	Transmisión glutamatérgica	++
<i>HTR2A</i>	13q14-21	Transmisión serotoninérgica	-
<i>IL1B</i>	2q14	Sistema inmune	+
<i>NOTCH4</i>	6p21.3	Neurodesarrollo	+++
<i>NRG1</i>	8p12-21	Sinapsis	Haplotipo
<i>NRXN1</i>	2p16.3	Sinapsis	ND
<i>PDE4B</i>	1p31	Sinapsis	ND
<i>PRODH</i>	22q11	Síntesis glutamatérgica	-
<i>RELN</i>	7q22	Sinapsis	ND
<i>RSG4</i>	1q23	Regulación proteína G	-

**Tabla 13.** Algunos de los genes candidatos asociados a esquizofrenia. El número de “+” indica la fuerza de la asociación. ND= No determinado. Adaptado de Tiwari et al., 2010

La mayoría de las asociaciones genéticas encontradas han sido sometidas a varios meta-análisis que han proporcionado listas de genes candidatos, priorizados por el OR resultante del análisis. Todas estas listas se encuentran disponibles en las bases de datos Schizophrenia Gene Resource (Jia, Sun, Guo, & Zhao, 2010) y Schizophrenia Database (Allen et al., 2008)

La falta de replicación de los estudios junto con la asociación de la esquizofrenia con genes implicados en procesos muy diversos ha llevado a definir lo que se denomina *endofenotipos*, que son fenotipos intermedios entre los genes de predisposición y el fenotipo de la enfermedad, y que por lo tanto pueden ser más cercanos a las alteraciones genéticas que la propia categoría diagnóstica de la esquizofrenia (Allen et al., 2009).

### 4.3. ETIOLOGÍA

La etiología de la esquizofrenia aún no se conoce con exactitud. A pesar de esto, existe evidencia de que la alteración de varios sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico o colinérgico, estaría implicada en los procesos fisiopatológicos que conducen a la aparición de la sintomatología de la esquizofrenia (Guillin, Abi-Dargham, & Laruelle, 2007).

Actualmente, se sugiere que un episodio agudo de esquizofrenia es el resultado de la convergencia entre un aumento en la neurotransmisión de dopamina, factores genéticos que alteran los mecanismos reguladores de la actividad de las neuronas de la corteza cerebral, y factores ambientales que causan la pérdida de neuronas y sus conexiones (Freedman, 2003).

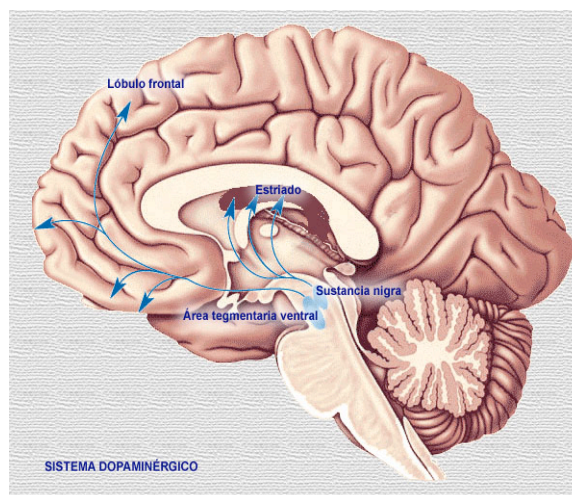
#### 4.3.1. Vías dopaminérgicas cerebrales

Existen cuatro vías dopaminérgicas cerebrales, con mecanismos moleculares distintos (Florez et al., 2003) (*Figura 19*):

1. La **Vía Nigroestriada**: desde la sustancia negra a los ganglios basales. Está relacionada con el control del movimiento.

2. La **Vía Mesolímbica**: desde el área tegmental hasta el núcleo *accumbens*. Está relacionada con la conducta y, por tanto, se cree que puede estar asociada con la psicosis propia de la esquizofrenia y la inducida.

3. La **Vía Mesocortical**: desde el área tegmental hasta la corteza límbica. Se cree que es la vía más relacionada con los síntomas negativos de la esquizofrenia.



*Figura 19. Vías dopaminérgicas cerebrales*

4. La **Vía Tuberoinfundibular**: desde el hipotálamo hasta la hipófisis. Está relacionada con la secreción de prolactina.

Además, existen cinco tipos de receptores dopaminérgicos (D1-D5), pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores se dividen en dos subfamilias con diferentes propiedades farmacológicas y bioquímicas: la subfamilia D1, que incluye los receptores D1 y D5 y la subfamilia D2 que incluye los D2, D3 y D4 (Dale, 2000). Estos receptores se encuentran tanto en el cerebro como en la periferia, dependiendo del tipo de receptor.

A nivel cerebral, salvo excepciones, los receptores de la subfamilia D1 predominan sobre los de la D2, y dentro de la subfamilia D1/D5, los D1 son los más abundantes (Flórez et al., 2003). La mayor densidad de receptores D1, implicado en el control del movimiento y las funciones cognitivas, se encuentra en las áreas donde termina el sistema nigroestriado y mesolímbico y en menor medida en hipotálamo, tálamo y corteza prefrontal (Flórez et al., 2003). Los receptores D5, cuya función aún no está clara, son muy escasos y se encuentran principalmente en el hipotálamo, hipocampo y núcleos del tálamo (Flórez et al., 2003).

Dentro de la subfamilia D2, los receptores de dopamina D2 son los que predominan en el cerebro, principalmente en las proyecciones de las vías nigroestriada y mesolímbica, y en menor medida en la corteza cerebral y en la hipófisis. Estos receptores estarían implicados en la regulación de la función motora, de ciertos aspectos de la conducta y en la secreción de prolactina. Los receptores D3 se localizan predominantemente en áreas límbicas y en menor medida en regiones de la corteza, y en muy baja proporción en el estriado. Los D4 se expresan principalmente en la corteza y sistema límbico, y no existen prácticamente en el núcleo estriado. La función de los receptores D3 y D4 todavía no está clara, pero su localización en área límbicas sugiere que jugarían un papel importante en funciones cognitivas, emocionales y de la conducta (Flórez et al., 2003).

#### 4.3.2. Hipótesis dopaminérgica

La razón que llevó a postular la hipótesis dopaminérgica fue el descubrimiento del mecanismo de acción de los fármacos neurolépticos, mediante el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 (DRD2, Creese, Burt, & Snyder, 1976), junto con la observación de que sustancias estimuladoras de la liberación de dopamina, como las anfetaminas, mimetizaban los síntomas de la esquizofrenia, (Carlsson, 1988). Esta hipótesis, que sigue siendo investigada hoy en día, es la más aceptada en la actualidad (Lang, Puls, Muller, Strutz-Seebohm, & Gallinat, 2007) y según ella los síntomas de la esquizofrenia serían el resultado de un exceso de neurotransmisión dopaminérgica, sobre todo en las regiones mesolímbica y estriada del cerebro, que conduciría a los síntomas positivos de la enfermedad, y un déficit en las regiones prefrontales que resultaría en los síntomas negativos y cognitivos (Lang et al., 2007).

Además, los estudios neuroquímicos de imagen son consistentes con la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, ya que en estados psicóticos agudos esta se asocia a un aumento en la síntesis, liberación y concentraciones sinápticas de dopamina (Guillin et al., 2007).

#### 4.3.3. Hipótesis glutamatérgica

Aparte de la hipótesis dopaminérgica, se han desarrollado otras teorías basándose en el mecanismo de acción de fármacos como la fenciclidina y la ketamina, que producen cuadros semejantes a los de la esquizofrenia, y que empeoran en esquizofrénicos su sintomatología (Krystal et al., 1994). Estos fármacos actúan bloqueando el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), por lo que se ha postulado que la hipofunción de este receptor estaría relacionada con la enfermedad.

La hipótesis glutamatérgica estaría reforzada por los índices anormales de glutamato encontrados en estudios *postmortem* en el cerebro de esquizofrénicos, uno de los ligandos del receptor NMDA. Esta hipótesis sería compatible con la hipótesis dopaminérgica, ya que parece haber conexiones recíprocas entre ambos sistemas (Miyamoto et al., 2003) (Leriché, Diaz, & Sokoloff, 2004).

Otros autores sugieren una posible implicación del neurotransmisor inhibitorio GABA, que mantendría el balance de excitación-inhibición (Freedman, 2003).

#### 4.3.4. Hipótesis serotoninérgica

Otra de las hipótesis postuladas es la serotoninérgica, que se basa en la implicación de los receptores de serotonina (principalmente los 5-HT<sub>2</sub>) en fenómenos psicóticos, así como en la afinidad que presentan los antipsicóticos atípicos por éstos (Miyamoto et al., 2003).

#### 4.4. TRATAMIENTO

El primer tratamiento utilizado en la esquizofrenia fueron los denominados antipsicóticos clásicos, potentes antagonistas de los receptores D<sub>2</sub> de dopamina, eficaces frente a los síntomas positivos de la enfermedad y con una alta incidencia de efectos adversos, entre los que destacan los efectos extrapiramidales (SEP) que producen (Kapur & Remington, 2001). Con el desarrollo de los antipsicóticos modernos, los denominados antipsicóticos atípicos, con una significativa menor incidencia de SEP y de hiperprolactinemia derivada del bloqueo dopaminérgico se ha mejorado de manera significativa el tratamiento de los pacientes esquizofrénicos (Kapur & Remington, 2001).

La clasificación de los antipsicóticos en clásicos y atípicos se mantiene en la actualidad y está recogida en la *tabla 14*.

Antipsicóticos clásicos
<b>Fenotiazinas</b>
Alifáticas: Clorpromazina y trifluopromazina
Piperidínicas: Tioridazina, metopimazina
Piperazínicas: Flufenazina, perfenazina, trifluoperazina
<b>Tioxantenos:</b> Clorprotixeno, zuclopentixol
<b>Butirofenonas:</b> Haloperidol
<b>Difenilbutilpiperidinas:</b> Pimozida
<b>Análogos de las fenotiazinas:</b> Loxapina, clotiapina
Antipsicóticos atípicos
<b>Benzamidas:</b> Sulpirida, tiaprida
<b>Dibenzodiazepinas:</b> Clozapina, olanzapina
<b>Dibenzotiazepinas:</b> Quetiapina
<b>Benzixosazoles:</b> Risperidona, paliperidona

**Tabla 14.**  
*Clasificación de los fármacos antipsicóticos (Flórez et al., 2003)*

#### 4.4.1. Mecanismo de acción y eficacia de los antipsicóticos

Las diferencias de eficacia y seguridad entre los antipsicóticos clásicos y los atípicos radican en su farmacodinamia: ambos bloquean los receptores dopaminérgicos D2 en las áreas límbicas del cerebro (*núcleo accumbens* y corteza cerebral) (Jarskog, Miyamoto, & Lieberman, 2007), pero los antipsicóticos clásicos lo hacen con una mayor afinidad. Se ha demostrado que para la obtención de una respuesta farmacológica óptima se requiere el bloqueo del 60-65% de los receptores DRD2 pero que ocupaciones por encima del 80% están asociadas al desarrollo de acontecimientos adversos como los efectos extrapiramidales (Kapur, Zipursky, Jones, Remington, & Houle, 2000). Los antipsicóticos atípicos muestran una constante de disociación mayor que los clásicos en su unión a los receptores DRD2, lo que permite una modulación del sistema dopaminérgico más leve y por tanto provocan menos efectos adversos (Kapur & Remington, 2001).

Aun cuando el mecanismo de los antipsicóticos atípicos no se conoce con exactitud, se sabe que se unen con alta afinidad a los receptores de serotonina 2A (5-HT<sub>2A</sub>) (*tabla 15*). Además, el efecto sinérgico del antagonismo de los receptores DRD2 y 5-HT<sub>2A</sub> produce un aumento de la función dopaminérgica prefrontal, lo que podría contribuir a explicar la eficacia de este grupo de fármacos (Flórez et al., 2003).

Por otro lado, los antipsicóticos atípicos muestran afinidad, aunque en menor grado, por los receptores de dopamina 3 y 4 (DRD3 y DRD4) y el receptor de serotonina 2C (5-HT<sub>2C</sub>) (*tabla 15*), que en parte podrían estar complementando su efecto terapéutico (Kapur & Remington, 2001) (Holmes, Lachowicz, & Sibley, 2004).

Diana	Haloperidol	Clozapina	Risperidona	Olanzapina	Quetiapina
DRD1	+	+	+	++	-
DRD2	++++	++	++++	+++	+
DRD3	++	+	++	+	-
DRD4	+++	++	+++	++	-
5-HT <sub>1A</sub>	-	+	-	-	-
5-HT <sub>1D</sub>	-	-	+	-	-
5-HT <sub>2A</sub>	+	+++	++++	+++	+
5-HT <sub>2C</sub>	-	++	++	++	-
5-HT <sub>6</sub>	-	++	-	++	-
5-HT <sub>7</sub>	-	++	+++	-	-
$\alpha_1$	+++	+++	+++	++	+++
$\alpha_2$	-	+	++	+	-
H1	-	+++	+	+++	--
M1	-	++++	-	+++	-
Transportador de serotonina	-	-	-	++	++
Transportador de dopamina	-	++	-	++	++
Transportador de noradrenalina	-	+	-	++	++

**Tabla 15.** Afinidad de los antipsicóticos por los diferentes receptores. Modificada de Jarskog et al., 2007. Las cruces indican la afinidad: baja (+), media (++), alta (+++) y muy alta (++++)

Respecto a la eficacia, ambos tipos de fármacos son efectivos en el tratamiento de los síntomas positivos de la enfermedad (*tabla 16*), pero no lo son tanto frente a los negativos (Kapur & Remington, 2001). Contrariamente al pensamiento general, los antipsicóticos clásicos son efectivos frente a estos síntomas, pero en menor grado que frente a los positivos. En cambio, con el tratamiento atípico, pueden aparecer síntomas negativos de manera secundaria (Kapur & Remington, 2001).



Eficacia (síntomas)	APC según la potencia			APA			
	Alta	Moderada	Baja	Clozapina	Risperidona	Olanzapina	Quetiapina
Positivos	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++
Negativos	+	+	+	++	+	+	+
<b>Efectos adversos</b>							
Anticolinérgicos	-	++	+++	+++	-	+	-
SEP	++++	+++	++	-	++	+	-
Hiperprolactinemia	++	++	++	-	++	+	-
Hipotensión	+	++	+++	+++	+++	++	++
Disfunción sexual	++	++	+++	++	++	++	+
Aumento de peso	-	+	++	+++	+	+++	++
DM2	+	+	+	++	+	++	+
Repolarización cardíaca	-	-	++	-	-	-	-

**Tabla 16.** Propiedades de los fármacos antipsicóticos según la eficacia y efectos adversos. Los antipsicóticos clásicos se muestran agrupados según su potencia. APC= Antipsicóticos clásicos; APA= Antipsicóticos atípicos; SEP= Síntomas extrapiramidales; DM2= Diabetes mellitas de tipo 2. Adaptado de Gardner, Baldessarini, & Waraich, 2005

#### 4.4.2. Efectos adversos

Los efectos adversos del tratamiento antipsicótico se derivan del bloqueo de los sistemas neurotransmisores. Entre los más frecuentes están la sedación, por bloqueo histaminérgico, sequedad de boca, problemas de motilidad intestinal y urinarios, en el caso de los antipsicóticos clásicos, derivados del bloqueo del sistema colinérgico; SEP e hiperprolactinemia, por el bloqueo dopaminérgico, hipotensión ortostática, debida al bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos; efectos adversos sexuales, por bloqueo de los sistemas adrenérgico y serotoninérgico; alteraciones cardiovasculares, aumento de peso y alteraciones metabólicas (Flórez et al., 2003) (Kapur & Remington, 2001) (Gardner et al., 2005) (Tabla 16).

Los SEP se observan con más frecuencia en el tratamiento antipsicótico clásico y son alteraciones del movimiento, derivadas del bloqueo dopaminérgico a nivel de la vía

nigroestriada (Kapur et al., 2000). Los SEP pueden clasificarse en agudos (parkinsonismo, acatisia y distonía), de aparición en las primeras semanas de tratamiento, y tardíos (distonía y discinesia tardía) que no aparecen antes de los 3-6 meses tras iniciarse el tratamiento (Kapur & Remington, 2001). En el caso de los antipsicóticos clásicos, el riesgo de desarrollarlos aumenta a mayor potencia antipsicótica del fármaco (*tabla I6*). Son considerados antipsicóticos de baja potencia clorpromazina y tioridazina; de potencia moderada, zuclopentixol; y de potencia alta, haloperidol y flufenazina, entre otros.

Por otro lado, aunque los atípicos están asociados a una menor incidencia de SEP, el riesgo varía en función del fármaco del que se trate (*tabla I6*). En este sentido, clozapina y quetiapina tienen una baja tasa de SEP, mientras que en risperidona y olanzapina es mayor y, además, dependiente de la dosis (Kapur & Remington, 2001).

La aparición de **hiperprolactinemia** depende de la afinidad que muestren los antipsicóticos por los receptores de dopamina D2, por ser esta el resultado del bloqueo de estos receptores a nivel de la vía tuberoinfundibular (Kapur, Roy, Daskalakis, Remington, & Zipursky, 2001). En consecuencia, mientras que los clásicos se asocian todos con aumento de los niveles de prolactina, en el caso de los atípicos varía en función del fármaco del que se trate. En concreto, risperidona se asocia a mayores elevaciones de prolactina comparada con otros antipsicóticos atípicos (*Tabla I6*) (Bushe & Shaw, 2007).

Los **efectos adversos sexuales** son relativamente frecuentes con el tratamiento antipsicótico y se asocian sobre todo a los antipsicóticos clásicos (Dossenbach et al., 2005). Generalmente estos efectos adversos son descenso de libido, disfunción orgásmica, eyaculatoria y eréctil en los hombres, o falta de lubricación vaginal en las mujeres (Ucok, Incesu, Aker, & Erkoc, 2007). Entre los antipsicóticos atípicos, risperidona y olanzapina son los fármacos con mayor incidencia de efectos adversos sexuales (*tabla I6*).

Especialmente los antipsicóticos atípicos son responsables de producir **efectos adversos endocrinos y metabólicos**. Un efecto adverso relativamente común es el **aumento de peso**, en el cual, a pesar de que los mecanismos causales no son del todo conocidos, parecen estar implicados los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C</sub> e histaminérgicos H1

(Wirshing et al., 1999). Se ha observado este efecto adverso con antipsicóticos atípicos y algunos clásicos (Gardner et al., 2005) y particularmente problemáticos olanzapina y clozapina (*tabla I6*) (Wirshing et al., 1999).

Igualmente, dentro de este grupo de efectos adversos, es relativamente frecuente desarrollar **intolerancia a la glucosa**, con el consiguiente riesgo de **diabetes mellitus de tipo 2**, que se ha visto que es doble en pacientes en tratamiento con antipsicóticos atípicos que con los clásicos (Hagg et al., 1998) y fundamentalmente con clozapina y olanzapina (Kapur & Remington, 2001). Otro efecto metabólico, sobre todo con antipsicóticos atípicos, es el **aumento de los niveles de lípidos**, especialmente de triglicéridos (Ghaeli & Dufresne, 1996). El mecanismo causal no se conoce ni tampoco si se produce de manera secundaria al aumento de peso o es independiente de él (Kapur & Remington, 2001).

Los factores descritos anteriormente contribuyen de manera significativa en determinados pacientes al aumento en los **factores de riesgo cardiovasculares**. Esto, sumado a que los pacientes con esquizofrenia tienen frecuentemente una mala nutrición y la tasa de fumadores es de hasta el 80%, hace que el riesgo cardiovascular asociado a los efectos adversos metabólicos cobre una especial importancia (Kapur & Remington, 2001). Por otro lado, el tratamiento antipsicótico se ha asociado a una prolongación de la repolarización ventricular, con una consecuente **prolongación del intervalo electrocardiográfico QT** (Gardner et al., 2005).

## 5. FARMACOGENÉTICA DE LA RISPERIDONA EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA

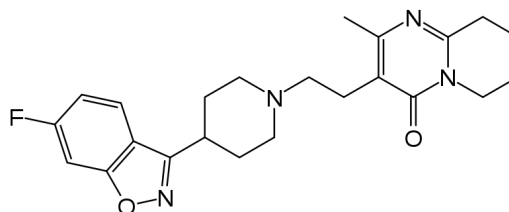
Risperidona ha sido uno de los tratamientos antipsicóticos más prescritos en Estados Unidos en los últimos diez años (Reist et al., 2007). Como ocurre con la mayoría de antipsicóticos, un alto porcentaje de pacientes abandona el tratamiento, el 74%, bien como consecuencia de la falta de eficacia, un 27%, o la aparición de efectos adversos, un 10% (Lieberman et al., 2005).

Con estas cifras, la farmacogenética se presenta como la gran promesa en el tratamiento con risperidona por su potencial utilidad en la discriminación de aquellos pacientes 'respondedores' de los 'no respondedores', así como de los pacientes en riesgo de desarrollar efectos adversos. Para estos últimos se podrían individualizar las dosis o pautar fármacos más apropiados (Johnson, 2003).

### 5.1. FARMACOCINÉTICA, FARMACODINAMIA Y EFECTOS ADVERSOS

Risperidona es un antipsicótico atípico con estructura benzisoxazólica (*figura I10*).

Como todos los antipsicóticos atípicos, presenta alta afinidad por los receptores 5-HT<sub>2</sub> y DRD2 y los  $\alpha_1$ -adrenérgicos, y una menor por los histaminérgicos H1 y  $\alpha_2$ -adrenérgicos (*Ficha técnica de la risperidona*).



*Figura I10. Estructura molecular de la risperidona*

En cuanto a la farmacocinética, risperidona se absorbe completamente tras su administración por vía oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 1 y 2 horas, proporcionales a las dosis administradas. En plasma se une a la albúmina y a las  $\alpha_1$ -glicoproteínas ácidas, en un 88%, y se distribuye rápidamente (*Ficha técnica de la risperidona*).

La risperidona se metaboliza en un 30-70% en el hígado por la enzima del sistema del citocromo P-450, CYP2D6, y da lugar a un metabolito activo, 9-OH-risperidona, con potencia terapéutica similar. Ambas forman lo que se denomina 'fracción antipsicótica activa', que se elimina mayoritariamente por la orina (*Ficha técnica de la risperidona*).

Los efectos adversos más frecuentes derivados del tratamiento con risperidona son sedación, alteraciones en la función sexual, disminución en la salivación, estreñimiento, aumento de peso y efectos adversos neurológicos (Lieberman et al., 2005).

## 5.2. FARMACOGENÉTICA DE RISPERIDONA. GENES ASOCIADOS

Los estudios realizados hasta la fecha en farmacogenética de la risperidona son estudios de asociación de genes candidatos farmacocinéticos, como *CYP2D6* y *MDR1*, y farmacodinámicos, principalmente *DRD2*, *DRD3*, *HTR2A* y *HTR2C*, con la eficacia, medida como cambio en las escalas BPRS o PANSS, y la aparición de efectos adversos, entre los que destacan los neurológicos, aumento de peso, elevación de lípidos en sangre o hiperprolactinemia .

### 5.2.1. Genes farmacocinéticos

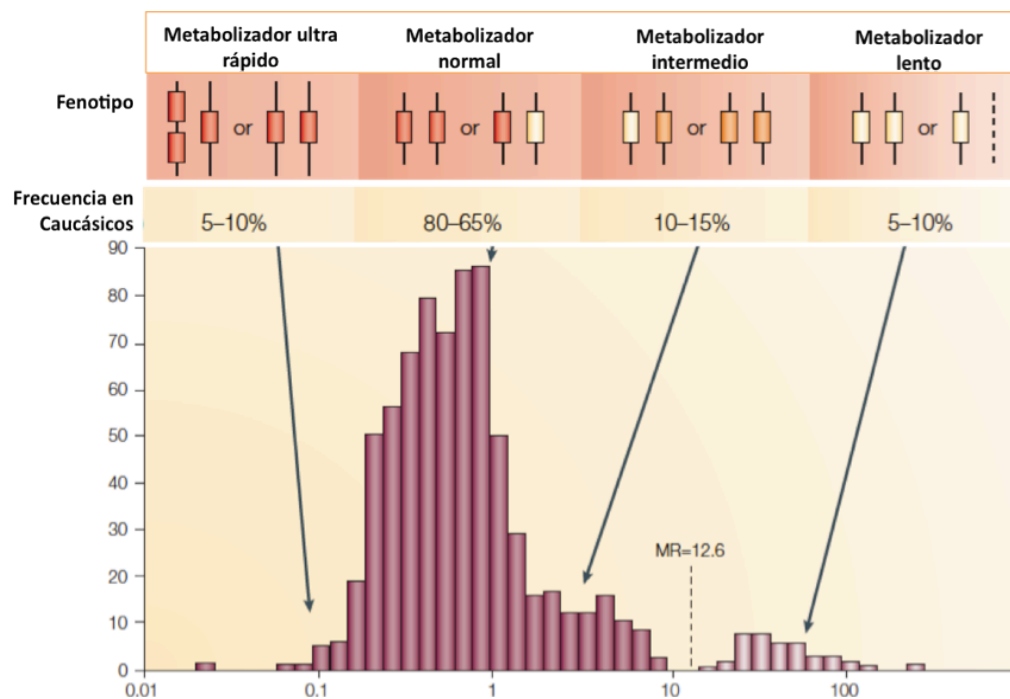
Se ha descrito ampliamente que variaciones en los genes que codifican los principales factores farmacocinéticos de risperidona, *CYP2D6*, *CYP3A4* y glicoproteína P, da lugar a proteínas con diferente actividad enzimática y, por tanto, en diferente respuesta al tratamiento con risperidona.

#### 5.2.1.1. Genes implicados en el metabolismo de risperidona: *CYP2D6* y *CYP3A4*

*CYP2D6* y, en menor medida, *CYP3A4* catalizan la conversión de risperidona a 9-OH-risperidona en el hígado. Ambas enzimas pertenecen a la familia del citocromo P-450, el grupo más importante de enzimas metabolizadoras de fármacos de fase I. Entre sus sustratos se encuentra más del 80% de los fármacos comercializados en la actualidad (Eichelbaum, Ingelman-Sundberg, & Evans, 2006). De entre todos los componentes de la familia, *CYP3A4* es la enzima más abundante en el hígado y responsable del metabolismo de aproximadamente el 50% de los fármacos más frecuentemente prescritos (Ingelman-Sundberg, Sim, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007) y, por su parte, *CYP2D6* metaboliza el 25% (Zanger, Raimundo, & Eichelbaum, 2004).

La importancia de estas enzimas en farmacogenética radica en que los genes que las codifican, *CYP3A4* y sobretodo *CYP2D6*, son altamente polimórficos, lo que determina la expresión de proteínas con diferente actividad (Gervasini et al., 2010).

En el caso de *CYP2D6* se han identificado más de 80 variantes genéticas, entre las que se hallan SNPs, deleciones y duplicaciones (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee, acceso diciembre 2010). Estas variaciones generan alelos con actividad ausente, disminuida, normal o aumentada, cuya combinación da lugar a individuos metabolizadores lentos, intermedios, normales o ultra rápidos (Gaedigk et al., 2008) (*Figura I10*). La frecuencia de cada tipo de metabolizador varía según las diferentes etnias. En el caso de metabolizadores lentos, la frecuencia en caucásicos es de 4-7%, mientras que en otras poblaciones no supera el 3% (de Leon, Sandson, & Cozza, 2008); y en el caso de metabolizadores ultrarrápidos, en norteafricanos puede llegar al 29%, cuando en caucásicos la frecuencia más alta encontrada ha sido del 10% (revisado en de Leon et al., 2008) (*Figura I11*).



**Figura I11.** Asociación genotipo-fenotipo para los polimorfismos de *CYP2D6*. Los alelos funcionales están representados en rojo; en naranja, los alelos con actividad reducida; y en amarillo, los alelos nulos. La línea discontinua indica la deleción del alelo. MR=ratio metabólico urinario (debrisoquina/4-OH-debrisoquina) con 12,6 como corte entre metabolizadores lentos y el resto. Adaptado de Meyer, 2004

Varios estudios han puesto en evidencia la relación entre el fenotipo lento de CYP2D6 con las concentraciones plasmáticas de risperidona y 9-OH-risperidona (Yasui-Furukori et al., 2004) y con la diferente respuesta al tratamiento respecto a la eficacia y a la mayor incidencia de efectos adversos (de Leon et al., 2005).

También para *CYP3A4*, se ha descrito un amplio número de variantes genéticas (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee, acceso diciembre 2010), con el alelo \*1B (-392 A>G en la región 5' UTR del gen) como uno de los más estudiados (Zhou et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que existe una amplia variabilidad interindividual en la actividad global de la enzima, el significado funcional de las variantes genéticas de *CYP3A4* aún no se ha descrito (Daly, 2010).

#### **5.2.1.2. Genes implicados en el transporte de risperidona: *MDR1* (Glicoproteína P)**

La glicoproteína P es un transportador de fármacos, dependiente de ATP, localizada en intestino, cerebro, riñón y otros órganos donde se ha visto que influencia las concentraciones y exposición tisular de sus sustratos, como risperidona (de Leon et al., 2008). El gen que la codifica, *MDR1* (Multidrug-resistance gene), localizado en el cromosoma 7, contiene polimorfismos que afectan la función de la proteína. En concreto, uno de los más estudiados, el SNP sinónimo 3435C>T en el exón 26, se ha visto que altera la expresión y función de la proteína (Hoffmeyer et al., 2000).

En relación con la risperidona, existen varios estudios en los que se asocian estos SNPs con la eficacia (Correia et al., 2010) y con la aparición de efectos adversos como aumento de peso (Kuzman et al., 2008) o poliuria y polidipsia (Shinkai et al., 2008).

#### **5.2.2. Genes farmacodinámicos**

La influencia de las variantes genéticas farmacodinámicas sobre la respuesta a risperidona es aún más difícil de establecer que para las variantes farmacocinéticas, debido fundamentalmente al limitado conocimiento del mecanismo de acción de los antipsicóticos (de Leon et al., 2008). Además, la variabilidad debida a los genes farmacodinámicos supera ampliamente a la de los farmacocinéticos. Esto es debido, en parte, a que mientras el control genético de las enzimas metabolizadoras de fármacos es

generalmente mediante un único *locus*, el mecanismo de acción de los antipsicóticos se produce través de la interacción de varias vías de neurotransmisión, lo que implica múltiples *loci* en el control genético de las mismas (Steimer, 2010).

Los factores genéticos farmacodinámicos más estudiados son variantes en los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos, a través de los cuales la risperidona ejerce su acción, y otros genes relacionados con estos sistemas.

#### **5.2.2.1. Receptores dopaminérgicos**

Al igual que el resto de los antipsicóticos, risperidona ejerce su acción mediante el bloqueo de los receptores DRD2 (Jarskog et al., 2007) y por consiguiente *DRD2* ha sido uno de los genes más estudiados en farmacogenética del tratamiento antipsicótico (de Leon et al., 2008). Las variantes funcionales que se han relacionado con la respuesta a risperidona son -141C *indel* y -241A>G (Lencz et al., 2006), en el promotor del gen, y Ser311Cys en la región codificante (Lane et al., 2004a). También la variante Taq1A, localizada en el gen contiguo a *DRD2*, *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*) (Neville, Johnstone, & Walton, 2004), ha sido asociada a respuesta (Yamanouchi et al., 2003).

Aunque con menor afinidad, risperidona también se une a los receptores DRD3 y DRD4 (*tabla 15*) y, por lo tanto, los genes que los codifican también han sido objeto de estudio en farmacogenética, principalmente *DRD3*. En este, el cambio Ser9Gly ha sido el más estudiado en relación a la respuesta y aparición de efectos adversos, fundamentalmente la discinesia tardía secundaria al tratamiento con antipsicóticos (Basile, Masellis, Potkin, & Kennedy, 2002). En concreto, esta variante ha sido asociada a una respuesta a risperidona variable y los resultados son contradictorios (Lane et al., 2005) (Reynolds, Yao, Zhang, Sun, & Zhang, 2005), (Xuan et al., 2008).

La variante más estudiada en el gen *DRD4* ha sido el VNTR de 48 pares de bases en el exón 3 en relación con la respuesta a risperidona (Zalsman et al., 2003) y los niveles de prolactina secundarios a este tratamiento (Yasui-Furukori et al., 2008), con resultados negativos en ambos casos.



### 5.2.2.2. Receptores serotoninérgicos

*HTR2A*, al igual que *DRD2*, ha sido objeto de numerosos estudios de asociación con respuesta a antipsicóticos con resultados contradictorios. Fundamentalmente, las principales variantes en las que se ha estudiado su influencia en la respuesta a risperidona han sido los polimorfismos -1438A>G y 102C>T, que en caucásicos se encuentran en completo desequilibrio de ligamiento (Arranz & Kapur, 2008). Ambos polimorfismos se han asociado a diferentes niveles de prolactina (Correia et al., 2010), a aumento de peso (Lane et al., 2006) o a respuesta (Benmessaoud et al., 2008) (Correia et al., 2010) (Kim, Choi, Kim, Song, & Joo, 2008).

Por otro lado, la variante -759C>T en el promotor del gen *HTR2C*, al igual que *HTR2A*, se ha asociado a eficacia del tratamiento con risperidona (Liu et al., 2010). Este gen ha sido extensivamente estudiado en relación con la ganancia de peso y el síndrome metabólico asociados a este tratamiento, con resultados positivos en todos los casos (Ryu et al., 2007) (Yevtushenko et al., 2008) (Mulder et al., 2007).

Por último, el gen *HTR7*, que también es uno de los factores farmacodinámicos de la risperidona, solo se ha estudiado en población china en la cual se ha asociado significativamente a la respuesta antipsicótica (Wei et al., 2009).

### 5.2.3. Otros genes

Otros genes estudiados en relación con la respuesta a risperidona han sido los relacionados con los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos como *BDNF* (Brain-derived neurotrophic factor), que modula la neurotransmisión serotoninérgica (Mossner et al., 2000) (Xu et al., 2010); *COMT*, que codifica la enzima catecol-o metil transferasa implicada en el metabolismo de la dopamina (Kang et al., 2010); los receptores de serotonina 1A y 6 (*HTR1A*, *HTR6*) (Mossner et al., 2009) (Lane et al., 2004b), o el transportador de serotonina, *SLC6A4* (Dolzan et al., 2008).

Adicionalmente se han estudiado una serie de genes potencialmente implicados en los mecanismos fisiopatológicos de efectos adversos. Por ejemplo, la asociación entre variantes en el gen de la leptina (*LEP*) y el aumento de peso (Ruano et al., 2007), o la hiperlipidemia observada en determinados pacientes y genes que codifican

apolipoproteínas de distintos tipos (Smith, Segman, Golcer-Dubner, Pavlov, & Lerer, 2008).

Desafortunadamente, los estudios farmacogenéticos sobre la influencia de variantes genéticas farmacodinámicas en la respuesta a risperidona no han proporcionado resultados concluyentes, en la mayoría de los casos. Además, pocas veces han podido ser validados en estudios independientes o en poblaciones con orígenes étnicos diferentes.

# *Material y Métodos*

## **1. SUJETOS**

### **1.1. PACIENTES**

245 pacientes esquizofrénicos fueron reclutados, durante su fase aguda, a lo largo de 5 años (2004-2009) en los servicios de psiquiatría de dos centros: 191 del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid (FJD) y 54 del Hospital Psiquiátrico de Mérida (Badajoz).

#### **1.1.1. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Ser mayor de edad ( $\geq 18$  años).
- Ser caucásico.
- Cumplir criterios DSM-IV de esquizofrenia.
- Estar de acuerdo con participar en el estudio y haber firmado el consentimiento informado.

#### **1.1.2. Variables demográficas y clínicas**

De estos pacientes se tomaron los siguientes datos demográficos y clínicos:

- Edad
- Sexo
- Dosis de risperidona
- Tratamientos concomitantes
- Tiempo de ingreso
- Escala PANSS (The Positive And Negative Syndrome Scale) al ingreso y al alta.
- Escala UKU de efectos secundarios (Udvalg Fur Kliniske Undersogelser) al alta.

Para las variables continuas se calculó la media y la desviación estándar (SD) y se comprobó el ajuste de los datos a una distribución normal. En el caso de las variables categóricas, se calculó la frecuencia relativa de cada categoría.

## **1.2. CONTROLES**

Los 449 controles reclutados procedían de tres centros:

- 13 del Servicio de Genética de la FJD (Madrid)
- 212 del Servicio de Farmacología del Hospital Universitario de Extremadura (HUE, Badajoz)
- 224 del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de La Princesa (HULP).

### **1.2.1. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Ser mayor de edad ( $\geq 18$  años).
- Ser caucásico
- No tener antecedentes personales, ni cuadro clínico de psicosis en el momento de la inclusión.
- Estar de acuerdo con participar en el estudio y haber firmado el consentimiento informado.

## **1.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LOS SUJETOS**

Tanto para los casos como para los controles los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- No cumplir los criterios de inclusión.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Presencia de enfermedades concomitantes que pudieran interferir con la evaluación de los parámetros en estudio (lesión orgánica, cerebral, retraso mental, demencia u otros).

## **2. ESCALAS UTILIZADAS EN LOS PACIENTES PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA RISPERIDONA**

Para evaluar la respuesta a risperidona, variable principal en el estudio farmacogenético, en términos de eficacia y seguridad, se emplearon dos escalas mediante las cuales se evaluó a los pacientes, al ingreso y/o al alta, por el psiquiatra encargado en cada caso.

### **2.1. ESCALA PANSS (ANEXO 1)**

La escala PANSS (*The Positive And Negative Syndrome Scale*) (Kay, Fiszbein, & Opler, 1987) evalúa el síndrome positivo y negativo de la esquizofrenia, y la psicopatología general desde un punto de vista dimensional (de gravedad del cuadro) y categórico (esquizofrenia positiva, negativa o mixta). Consta de 30 ítems organizados en tres escalas: positiva y negativa, ambas con 7 ítems, y de psicopatología general, de 16 ítems, que evalúa la presencia de otro tipo de síntomas en el paciente esquizofrénico. Cada ítem se puntúa según una escala Likert de 7 grados de intensidad en la que el 1 equivale a ausencia y el 7 a gravedad extrema del síntoma.

### **2.2. ESCALA UKU DE EFECTOS SECUNDARIOS (ANEXO 2)**

La escala UKU (Udvalg Fur Kliniske Undersogelser) es una escala de puntuación de efectos secundarios debidos a fármacos psicotropos, desarrollada en 1987 para su uso en ensayos clínicos y en la práctica clínica (Lingjaerde, Ahlfors, Bech, Dencker, & Elgen, 1987). Incluye 48 ítems (efectos adversos individuales) agrupados en 4 categorías: Efectos secundarios psíquicos, neurológicos, autonómicos y otros, así como su relación causal con el tratamiento antipsicótico (“improbable”, “posible”, “probable”). La puntuación posible para cada ítem es 0, en el caso de ausencia de efecto adverso, de 1 a 3 según la severidad que presenta el efecto (“1”=leve, “2”=moderado y “3”=grave) y 9 en el caso de ser no evaluable.

El periodo de tiempo al cual se refieren la mayoría de los efectos adversos son las 72 horas previas a la evaluación.

Ambas escalas han sido validadas en español (Peralta Martin & Cuesta Zorita, 1994) (Fleischhacker, Keet, & Kahn, 2005).

### **3. GENOTIPADO**

El genotipado de los sujetos se realizó mediante un array específico de farmacogenética, denominado *PHARMAChip®*, que incluye variantes en genes implicados en la respuesta terapéutica a una gran variedad de fármacos y mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **3.1. OBTENCIÓN DEL ADN.**

El ADN de los pacientes y los controles se extrajo, a partir de 7 ml de sangre periférica recogida con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), mediante dos métodos.

##### **3.1.1. Extracción automática**

Mediante este método de extracción se obtuvo el ADN de 97 pacientes procedentes de la FJD y los 211 controles procedentes del Servicio de Farmacología Clínica del HULP.

La extracción automática se realizó con los sistemas *MagNA Pure (Roche)* y *BioRobot EZ1 (QIAGEN)* siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Ambos sistemas utilizan para la extracción la tecnología de partículas magnéticas a las cuales se une el ADN procedente de la muestra de partida, en presencia de una sal caotrópica, para posteriormente ser separado mediante un imán.

##### **3.1.2. Extracción manual**

Mediante extracción manual, con fenol-cloroformo, se obtuvieron muestras de ADN de 94 pacientes procedentes de la FJD (la extracción se realizó en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid), de 200 controles del Servicio de Farmacología Clínica del HUE, y 55 pacientes psiquiátricos procedentes del Hospital Psiquiátrico de Mérida (Badajoz).

##### **3.1.3. Determinación de la concentración del ADN**

La concentración y la calidad de las muestras se determinaron en un espectrofotómetro de absorbancia *NanoDrop ND-1000®*.

### 3.2. GENOTIPADO CON *PHARMAChip*®

Las muestras de los pacientes y los controles fueron enviadas a la empresa *Progenika Biopharma* para su genotipado con el chip de farmacogenética *PHARMAChip*®.

*PHARMAChip*® es un array de genotipado farmacogenético de baja densidad basado en sondas alelo-específicas. Incluye 90 variantes, SNPs y VNTRs, en 36 genes que codifican proteínas relacionadas con la respuesta terapéutica, como enzimas metabolizadoras de fármacos de fase I (citocromo P-450) y de fase II, transportadores de fármacos, receptores y otras proteínas relacionadas (*Tabla M1*).

El diseño, la fabricación, validación y análisis del array se fundamenta en la metodología descrita por Tejedor y colaboradores (Tejedor et al., 2005). Para cada mutación se emplean dos parejas de sondas, una específica para el alelo silvestre (wt) y otra para la variante de interés, de 19 a 27 nucleótidos de tamaño. En el caso de los SNPs, el nucleótido diana es aquel que difiere entre la secuencia wt y la secuencia mutada, y en el caso de inserciones, duplicaciones o deleciones, la diana es el primer nucleótido que difiere entre las dos secuencias. Este nucleótido diana se encuentra siempre en la posición central del oligonucleótido consiguiéndose así maximizar la especificidad de hibridación (Tejedor et al., 2005).

Para cada muestra se realizan 7 PCRs independientes. Todos los genes, excepto el *CYP2D6*, se amplifican mediante 5 reacciones PCR multiplex (I a V). Para *CYP2D6* son necesarias otras dos reacciones de PCR adicionales, una para las duplicaciones y otra para las deleciones. Las duplicaciones de *CYP2D6* se detectan con otra reacción de PCR multiplex (VI) utilizando una mezcla de cebadores que flanquean la región codificante del gen (de 4700 pares de bases -pb-) y una secuencia específica que identifica la existencia de múltiples copias del *CYP2D6* (fragmento de 3500 pb). La segunda PCR adicional (PCR VII), utiliza distintos cebadores para la amplificación de la región codificante del *CYP2D6* y para una región específica de delección. En ambas PCRs, la co-amplificación de todo el gen *CYP2D6* sirve para la determinación del haplotipo y como control positivo de amplificación.



Todas las reacciones multiplex se llevan a cabo en un termociclador *Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)* bajo las mismas condiciones, que son las siguientes:

94°C	10"	}	<b>10 ciclos</b>
60°C	30"		
68°C	5'		

94°C	15"	}	<b>25 ciclos</b>
60°C	30"		
66°C	5' + 5"/ciclo		

Posteriormente, los productos de PCR se mezclan y fragmentan mediante la enzima ADNasa I con la que se obtienen fragmentos de menos de 50 nucleótidos de tamaño. A continuación, estos fragmentos se marcan con biotina en su extremo 5', se añaden al tampón de hibridación y se adiciona además una solución de oligonucleótidos biotinilados que sirve como control de la hibridación. Esta solución se hibrida con las sondas fijadas en un portaobjetos de vidrio modificado químicamente y se revela con un colorante fluorescente Cy3 conjugado con estreptavidina.

Finalmente, se *escanea* el chip (*InnoScan® 700 Microarray Scanner-Innopsys*) y se transforman los resultados de intensidad al genotipo correspondiente mediante el uso de un *software* desarrollado por *Progenika*.

Los resultados se traducen en el genotipo según unos grupos previamente definidos, usando para cada uno la señal de más de 10 controles. En el caso de los haplotipos (genes implicados en el metabolismo de fase I y fase II), el *software* es capaz de asignar el genotipo a partir de la combinación de SNPs.

Para las muestras cuyo genotipo no coincide con ninguno de los definidos en los grupos, el resultado proporcionado es *unknown combination* (no determinado).

GEN	NOMBRE	VARIANTE
<b>METABOLISMO DE FASE I</b>		
<i>CYP1A1</i>	Citocromo P450 1A1	*1, *2B, *2C
<i>CYP1A2</i>	Citocromo P450 1A2	*1, *1C (rs2069514), *1F (rs762551), *7, *11
<i>CYP2B6</i>	Citocromo P450 2B6	516G>T (rs3745274)
<i>CYP2C19</i>	Citocromo P450 2C19	*1, *2, *3, *4, *5, *7, *8, *9, *10
<i>CYP2C8</i>	Citocromo P450 2C8	*1, *2, *3, *4
<i>CYP2C9</i>	Citocromo P450 2C9	*1, *2, *3, *4, *5, *6
<i>CYP2D6</i>	Citocromo P450 2D6	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *40, *41; *1XN, *2XN, *4XN, *10XN, *17XN, *35XN, *41XN
<i>CYP3A4</i>	Citocromo P450 3A4	*1, *1B (rs2740574)
<i>CYP3A5</i>	Citocromo P450 3A5	*1, *3, *6, *8, *9, *10
<b>METABOLISMO DE FASE II</b>		
<i>GSTM1</i>	Glutation-S-transferasa M1	Presente/Nulo
<i>GSTM3</i>	Glutation-S-transferasa M3	*A, *B (rs1799735)
<i>GSTP1</i>	Glutation-S-transferasa P1	*A, *B (rs947894)
<i>GSTT1</i>	Glutation-S-transferasa T1	Presente/Nulo
<i>NAT2</i>	N-Acetil transferasa 2	*4, *5A, *5B, *5C, *6A, *7B, *12A, *12B, *13, *14A, *14B
<i>TPMT</i>	Tiopurina S-Metil transferasa	*1, *2, *3A, *3B, *3C, *3D
<i>UGT1A1</i>	UDP Glucuronil transferasa 1 subtipo A1	*1, *28 (rs8175347)
<b>TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS</b>		
<i>MDR1</i>	Glicoproteína P	3435C>T (rs1045642)
<i>SLC6A4</i>	Transportador de serotonina	VNTR 44bp (S/L) (rs4795541)
<b>RECEPTORES DE FÁRMACOS</b>		
<i>ADRB1</i>	Receptor β1 adrenérgico	Arg389Gly (rs1801253)
<i>ADRB2</i>	Receptor β2 adrenérgico	Arg16Gly (rs1042713)
<i>AGTR1</i>	Receptor 1 de angiotensina	1166A>C (rs5186)
<i>BDKRB2</i>	Receptor B2 de bradicinina	-58C>T (rs1799722)
<i>DRD3</i>	Receptor D3 de dopamina	Ser9Gly (rs6280)
<i>GRIN2B</i>	Subunidad 2B del receptor glutamatérgico NMDA	2664C>T (rs1806201)
<i>HTR2A</i>	Receptor 2A de serotonina	-102>C (rs1806201) His452Tyr (rs6314)
<b>OTROS</b>		
<i>ADD1</i>	Aducina 1	Gly460Trp (rs4961)
<i>AGT</i>	Angiotensinogeno	Met235Thr (rs699)
<i>BCHE</i>	Butirilcolinesterasa	Ala539Thr (variante K; rs1803274) Asp70Gly (variante atípica; rs1799807)
<i>COMT</i>	Catecol-O-Metil transferasa	Val158Met (rs4680)
<i>DPYD</i>	Dihidropirimidina deshidrogenasa	IVS14+1G>A (rs3918290)
<i>ERCC2</i>	Proteína reparadora de DNA	Lys751Gln (rs13181)
<i>IL10</i>	Interleucina 10	1082G>A (rs1800896)
<i>MTHFR</i>	Metilentetrahidrofolato reductasa	677C>T (rs1801133)
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral α	-308C>T (rs1800629)
<i>TYMS</i>	Timidilato sintasa	Indel de 6pb 3'-UTR (rs34489327)
<i>VKORC1</i>	Complejo epóxido reductasa de vitamina K, subud. 1	1639G>A (rs9923231)

Tabla M1. Variantes genéticas incluidas en PHARMAChip®. NMDA: N-Metil D-Aspártico.

### 3.3. OTROS MÉTODOS DE GENOTIPADO

Además del array de genotipado farmacogenético, *PHARMAChip*®, se emplearon otros métodos de genotipado alternativos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de fragmentos, la discriminación alélica o la secuenciación.

Así se determinaron:

- Los alelos L y S de *SLC6A4* y \*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*10, \*1XN y \*2XN del *CYP2D6*, cuyos resultados se utilizaron para calcular la sensibilidad y especificidad de *PHARMAChip*®.
- Las variantes genéticas no incluidas en *PHARMAChip*®, seleccionadas para el estudio farmacogenético o de asociación (sección 4.5) (*tabla M2*).

Gen	Nombre	Variante
<i>ADRA1</i>	Receptor adrenérgico $\alpha_1$	-4884 A>G (rs922733)
		-4155 C>G (rs2644627)
		-563 C>T (rs1383914)
<i>BDNF</i>	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>	Val66Met (rs6265)
<i>DRD2</i>	Receptor dopaminérgico D2	Taq1A (rs1800497)
<i>HTR1A</i>	Receptor de serotonina 1A	-1019 C>G (rs6295)
<i>HTR2C</i>	Receptor de serotonina 2C	-759C>T (rs3813929)
<i>HTR6</i>	Receptor de serotonina 6	267 T>C (rs1805054)
<i>IL-10</i>	Interleucina 10	-592 C>A (rs1800872)

*Tabla M2. Variantes genéticas no incluidas en PHARMAChip®*

#### 3.3.1. Análisis de fragmentos. Genotipado de *SLC6A4*

El genotipado del polimorfismo de longitud del promotor del gen *SLC6A4* (inserción/delección de 44 pares de bases -alelos L-largo- y S-corto-) se realizó en dos centros, el Servicio de Farmacología del HULP y en el Servicio de Genética de la FJD, mediante un análisis de fragmentos según lo descrito por Gelernter y colaboradores (Gelernter, Kranzler, & Cubells, 1997). Las condiciones de la PCR se detallan en la *tabla M3*.

El producto de PCR se sometió a electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* y los resultados fueron analizados con el programa

*GeneMapper 4.0v* (ambos de *Applied Biosystems*), según las instrucciones del fabricante.

Reactivo (fabricante)	Concentración	Ciclos de temperaturas	
ADN	50-100 ng/μL		
Tampón 10x ( <i>Roche</i> )	1,5 mM de MgCl <sub>2</sub>	94°C	90"
Nucleótidos ( <i>Invitrogen</i> )	1,25 mM (cada uno)	94°C	15"
Cebadores ( <i>Applied Biosystems</i> )	10 μM	66°C	30"
Taq Polimerasa ( <i>Applied Biosystems</i> )	2,5 U	72°C	30"
Dimetil sulfóxido (DMSO)	20% del volumen final	72°C	2'
Agua estéril ( <i>Braun</i> )	Csp 30 μL		

**Tabla M3.** Condiciones de genotipado del VNTR de *SLC6A4*. Csp: Cantidad suficiente para

Así, el alelo fue asignado como L cuando el tamaño del amplicón fue de aproximadamente 550 pb y como alelo S cuando fue de aproximadamente 510 pb.

### 3.3.2. Genotipado de *CYP2D6*

El genotipado de los alelos \*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*10, \*1XN y \*2XN del *CYP2D6* se realizó mediante métodos basados en la PCR.

#### 3.3.2.1. Determinación de los alelos \*3, \*4, \*6, \*9 y \*10

Los alelos \*3, \*4, \*6, \*9 y \*10 de *CYP2D6* se determinaron en los Servicios de Farmacología Clínica de HULP y HUE según la metodología descrita previamente (Chen et al., 1996) (Heim & Meyer, 1990) (Dorado et al., 2005).

#### 3.3.2.2. Determinación de las deleciones (\*5) y duplicaciones (\*1XN y \*2XN)

La deleción de *CYP2D6* y los alelos \*1XN y \*2XN se determinaron en el Servicio de Farmacología del HULP con las condiciones previamente descritas en la literatura (Lovlie, Daly, Molven, Idle, & Steen, 1996) (Steen et al., 1995).

### 3.3.3. Discriminación alélica mediante PCR a tiempo real

Mediante discriminación alélica se determinaron las variantes en los genes *ADRA1*, *DRD2*, *HTR1A*, *HTR2C* e *IL-10* (tabla M4).

Este ensayo utiliza dos sondas *TaqMan*® complementarias a cada uno de los alelos. Cada una posee un fluorocromo diferente en su extremo 5' y un *quencher* (molécula apantalladora de la fluorescencia) en el 3'. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR, la ADN polimerasa rompe las sondas hibridadas con el ADN, separando el fluorocromo del *quencher* y detectándose así la emisión de fluorescencia (de una de las dos sondas en homocigotos o de las dos en heterocigotos).

#### 3.3.3.1. Sondas (tabla M4)

Para todas las variantes (polimorfismos de tipo SNP), excepto para Val66Met en *BDNF* se utilizaron sondas *TaqMan*® de genotipado previamente diseñadas y validadas por *Applied Biosystems* (*TaqMan*® SNP Genotyping Assays, *Applied Biosystems*).

Gen	Variante	Sonda
<i>ADRA1</i>	-4884A>G (rs922733)	c__8795095_10
	-4155C>G (rs2644627)	c__15912574_10
	-563C>T (rs1383914)	c__2696575_1_
<i>DRD2</i>	Taq1A (rs1800497)	c__7486676_10
<i>HTR1A</i>	-1019C>G (rs6295)	c__11904666_10
<i>HTR2C</i>	-759C>T (rs3813928)	c__32343284_10
<i>HTR6</i>	267T>C (rs1805054)	c__1264819_10
<i>IL-10</i>	-592C>A (rs1800872)	c__747363_10

**Tabla M4.** Sondas empleadas en la discriminación alélica

#### 3.3.3.2. Condiciones (tabla M5)

Reactivo (fabricante)	Volúmenes	Ciclos de temperaturas			
ADN	1 µL (20 ng/µL)	50 °C	2'	} 41 ciclos	
MasterMix Roche	6,25 µL	95 °C	10'		
Cebador-sonda ( <i>Applied Biosystems</i> )	0,62 µL	95 °C	15"		
Agua estéril ( <i>Braun</i> )	Csp 12,5 µL	60 °C	1'		

**Tabla M5.** Condiciones de la discriminación alélica

### 3.3.4. Secuenciación

La secuenciación se empleó:

- Para genotipar la variante Val66Met del gen *BDNF*
- Para comprobar la veracidad de los resultados obtenidos por discriminación alélica.
- Como *Gold Standard* en el caso de discrepancias entre los resultados de *PHARMACHip®* y los obtenidos por métodos basados en la PCR.

#### 3.3.4.1. Cebadores utilizados (tabla M6)

Todos los cebadores, excepto los de la variante Taq1A, se diseñaron con el programa *Primer3* versión 4.0.

Gen	SNP	Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
<b>ADRA1</b>	-4884 A>G (rs922733)	F	CCCAGAGAGAATGGACCTGA	chr8: 26,727,155-
		R	AGCATCCCTGACACACCACT	26,727,538
	-4155C>G (rs2644627)	F	GCTTCTCAGCCTGTGACCA	chr8: 26,726,462-
		R	CAAAATGAGCAGAAAGGGAGTT	26,726,847
	-563C/T (rs1383914)	F	TTTTCCGCGTGTCTTATTC	chr8: 26,722,856-
		R	AGCTCAGCACAGCCTCTTTC	26,723,239
<b>BDNF</b>	Val66Met (rs6265)	F	GGACCCCTCATGGACATGTTT	chr11: 27,679,733-
		R	TCCACCAGGTGAGAAGAGTG	27,680,131
<b>DRD2</b>	Taq1A (rs1800497)	F	TGGCTTAGAACCACCCAGAGT	chr11:112,775,912-
		R	ACCTTCCTGAGTGTCAATCAACC	112,776,178*
<b>HTR1A</b>	-1019C>G (rs6295)	F	CCCAGAGTGGCAATAGGAGA	chr5: 63,258,445-
		R	CCGTTTGTGTTGTTGTGTCG	63,258,675
<b>HTR2C</b>	-759C>T (rs3813929)	F	ACCCTGTGAGTGCCTCAGTT	chrX: 113,818,084-
		R	TTGGACCGGTCTCTTAGTGC	113,818,456
<b>HTR6</b>	267T>C (rs1805054)	F	CCAACTCGCTGCTGATCG	chr1: 19,992,374-
		R	GTCATGCGCAGCTTGAGC	19,992,662
<b>IL-10</b>	Promotor (rs1800872)	F	GACAACACTACTAAGGCTTCTTTGG	chr1:206,946,385-
		R	TGTAGGAAGCCAGTCTCTGGA	206,946,924
<b>SLC6A4</b>	44pb indel (rs4795541)	F	6FAM-CTTGTGTTGGGATTCTCCCGCCTGGCGTT	chr17:25,588,098-
		R	GGCTGAGCGTCTAGAGGGACTGAGCTGG	25,588,661**

**Tabla M6.** Cebadores empleados en la PCR y secuenciación de las variantes no incluidas en *PHARMACHip®*. \*Cebadores tomados de López-Rodríguez, R, 2010. \*\*NCBI36/hg18

### 3.3.4.2. Condiciones de la PCR (tabla M7)

Los ciclos de temperaturas de las PCRs se optimizaron en un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* y después, las sucesivas PCRs se realizaron en termocicladores *GeneAmp PCR System 2700*, ambos de *Applied Biosystems*.

Reactivo (fabricante)	Concentración	Ciclos de temperaturas	
ADN	50-100 ng/μL	95°C	5'
Tampón 10x ( <i>Roche</i> )	1,5 mM de MgCl <sub>2</sub>	95°C	20-30"
Nucleótidos ( <i>Invitrogen</i> )	1,25 mM (cada uno)	66°C	20-30"
Cebadores ( <i>Metabión</i> )	10 μM	72°C	40"
Taq Polimerasa ( <i>Roche</i> )	2,5 U	72°C	10'
Agua estéril ( <i>Braun</i> )	Csp 20 μL		

**Tabla M7.** Condiciones de las PCRs realizadas. Los tiempos de 20" son los utilizados en la amplificación del promotor de *IL-10* y los de 30" los del resto de los genes

El producto de PCR se purificó mediante dos métodos, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- El kit de purificación *E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega)*.
- *ExoSAP-IT® (USB)*.

### 3.3.4.3. Condiciones de la reacción de secuenciación (tabla M8)

La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)*.

Reactivo (fabricante)	Volúmenes		Ciclos de temperaturas	
ADN (producto de PCR)	6 μL	1,25 μL**	94°C	3'
Premix ( <i>Applied Biosystems</i> )*	3,5 μL	0,5 μL**	96°C	10"
Buffer ( <i>Applied Biosystems</i> )	1 μL	2,4 μL**	50°C	5"
Cebador ( <i>Metabión</i> )	1 μL	1,2 μL**	60°C	4'
Agua estéril ( <i>Braun</i> )	Csp 20 μL	4,4 μL**		

**Tabla M8.** Condiciones de la reacción de secuenciación. \*El Premix (*BigDye 1.1* y *3.1*) contiene tampón de la reacción, dNTPs (90%), ddNTPs (10%) y ADN polimerasa. \*\*Condiciones de la reacción de secuenciación en el caso de producto de PCR purificado con *ExoSAP-IT®*

El producto de esta reacción se resolvió mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático (*ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) y la información obtenida se analizó mediante el programa informático *Sequencing Analysis Software v 5.2*, según las instrucciones del fabricante.

#### 4. ANÁLISIS DE DATOS

Con las variables demográficas y clínicas de los pacientes y los genotipos de todos los sujetos se creó una base de datos para facilitar el análisis.

En primer lugar, con los datos de genotipado obtenidos con *PHARMAChip<sup>®</sup>* en pacientes y/o controles se determinaron sus características analíticas en términos de sensibilidad, especificidad, precisión y tasa de genotipado, para así evaluar su posible utilidad en la práctica clínica.

A continuación, para todos los pacientes y los controles se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas estudiadas y se determinó el cumplimiento de la Ley de Hardy-Weinberg.

En el caso de los pacientes, se evaluó la asociación de los genotipos de las variantes genéticas incluidas con la eficacia y la aparición de efectos adversos secundarios al tratamiento con risperidona.

En la población control, los datos de frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas se compararon con las descritas en las bases de datos HapMap o PubMed. Además, en el caso de los genes multialélicos *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *NAT2* y *TPMT*, los genotipos se agruparon según la funcionalidad resultante de la combinación de sus alelos y se determinó la frecuencia de metabolizadores lentos y ultrarrápidos.

Finalmente, con los pacientes y controles se llevó a cabo un estudio de asociación con la esquizofrenia, utilizando las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas, con el fin de evaluar su posible efecto de riesgo o protector en el desarrollo de la enfermedad.



## 4.1. CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS Y ESTIMACIÓN DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

### 4.1.1. Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron con las *ecuaciones E1 y E2*.

**E1.** Frecuencia del alelo  $p = A_1/2n$   
Frecuencia del alelo  $q = A_2/2n$

**E2.** Frecuencia del genotipo  $p^2 = A_1A_1/n$   
Frecuencia del genotipo  $2pq = A_1A_2/n$   
Frecuencia del genotipo  $q^2 = A_2A_2/n$

### 4.1.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se analizó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todas las variantes genéticas analizadas en este estudio, en casos y controles

Las ecuaciones que expresan el EHW en términos algebraicos se muestran en la *ecuación E3*.

**E3.**  $p + q = 1$   
 $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

La detección de las desviaciones del EHW se realizó mediante la comparación de las frecuencias observadas y las esperadas mediante la prueba estadística Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ;  $p \leq 0,050$ ), con el paquete estadístico R.2.10.0 (*R Project for Statistical Computing*).

## 4.2. RECODIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS DE *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *NAT2* y *TPMT*

Para los genes multialélicos, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *NAT2* y *TPMT* se agruparon los genotipos en base a la actividad resultante de la combinación de sus alelos.

#### 4.2.1. Codificación de los genotipos de los genes del citocromo P-450

Para la codificación de los genotipos de *CYP2C19* y *CYP2C9* se utilizó la funcionalidad de los alelos descrita en la base de datos *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* y para el *CYP2D6* se utilizó el *Activity Score* propuesto por Gaedigk y colaboradores (Gaedigk et al., 2008).

##### 4.2.1.1. *CYP2C19* y *CYP2C9* (tabla M9)

Para los dos genes los genotipos se clasificaron en:

- Metabolismo **normal**: portadores del genotipo silvestre \*1/\*1.
- Metabolismo **intermedio**: portadores de un alelo defectivo.
- Metabolismo **lento**: portadores de dos alelos defectivos.

Gen	Actividad normal	Actividad disminuida	Actividad ausente
<i>CYP2C19</i>	*1	*9, *10	*2, *3, *4, *5, *7, *8
<i>CYP2C9</i>	*1	*2 ( <i>in vitro</i> ), *3, *5	*6

**Tabla M9.** Funcionalidad de los alelos de los genes *CYP2C19* y *CYP2C9*

##### 4.2.1.2. *CYP2D6*

Según Gaedigk y colaboradores, cada alelo de *CYP2D6* tiene asignado un valor en base a su funcionalidad. De este modo, el *Activity Score* es el valor resultante de la combinación de los alelos y define los distintos tipos de metabolizadores (tabla M10) (Gaedigk et al., 2008).

Alelo	Valor	Activity score	Fenotipo
*3, *4, *4xN, *5, *6, *7, *8, *11, *14A, *14B, *15, *16, *19, *20, *36, *40, *42, *56B	0	0	Metabolizador lento
*9, *10, *17, *29, *41	0,5	0,5-1	Metabolizador intermedio
*1, *2, *35, *10xN, *17xN, *41xN	1	1,5-2	Metabolizador normal o rápido
*1xN, *2xN, *35xN	2	>2	Metabolizador ultra-rápido

**Tabla M10.** Conversión de los genotipos en fenotipos en función del *Activity Score* propuesto por Gaedigk y colaboradores. Adaptado de Gaedigk et al., 2008

## 4.2.2. Codificación de los genes del metabolismo en fase II

### 4.2.2.1. NAT2

Para el gen de la N-Acetil transferasa, los genotipos se clasificaron en función de la combinación de los alelos, cuya actividad está descrita en la base de datos Consensus Human Arylamine N-Acetyltransferase Gene Nomenclature (*tabla M11*), en:

- Metabolismo **normal**: homocigotos y heterocigotos de alelos de actividad aumentada.
- Metabolismo **intermedio**: portadores de un alelo de actividad disminuida.
- Metabolismo **lento**: homocigotos para los alelos de actividad disminuida.

Actividad aumentada	Actividad disminuida
*4, *11A, *12A, *12B, *12C, *13	*5A, *5B, *5C, *5D, *5J, *6A, *6B, *6C, *7A (dependiente de sustrato), *14A, *14B

*Tabla M11. Funcionalidad de los alelos del gen NAT2*

### 4.2.2.2. TPMT

La codificación de los genotipos del gen de la Tiopurina-S-Metil transferasa se basó en lo descrito en la base de datos *The Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB)* y fueron:

- Metabolismo **normal**: portadores del genotipo silvestre \*1/\*1.
- Metabolismo **intermedio**: portadores de un alelo con actividad intermedia o disminuida.
- Metabolismo **lento**: portadores de dos alelos con actividad intermedia o disminuida.

La funcionalidad de los alelos se muestra en la *tabla M12*.

Actividad normal	Actividad intermedia	Actividad disminuida
*1	*3D	*2, *3A, *3B, *3C, *7, *8

*Tabla M12. Funcionalidad de los alelos del gen TPMT*

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE PHARMAChip®

Las características analíticas de PHARMAChip® se calcularon para el total de individuos genotipados, incluyéndose tanto casos como controles. Para ello se calcularon la tasa de genotipado, la sensibilidad, la especificidad y la precisión como principales variables, además de otras como el tiempo de espera y la manipulación.

#### 4.3.1. Tasa de genotipado

La tasa de éxito de genotipado fue calculada para el total de muestras procesadas y para el total de genotipos posibles.

##### 4.3.1.1. Tasa de genotipado del total de muestras (% de éxito)

Se calculó como el número de muestras genotipadas con éxito del total de muestras procesadas en *Progenika*.

##### 4.3.1.2. Tasa de genotipado del total de genotipos (% de éxito)

Se calculó como el número de genotipos obtenidos entre el total de genotipos posibles.

#### 4.3.2. Sensibilidad y especificidad de PHARMAChip®

La sensibilidad (S) y especificidad (E) se calcularon como se muestra en las ecuaciones E4 y E5, para:

- Los principales polimorfismos del *CYP2D6* en población caucásica
  - Alelos \*4 y \*6, en 155 individuos.
  - Alelo \*10, en 84 individuos.
  - Alelos \*3, \*5 (delección), \*9, \*1XN y \*2XN (duplicaciones) en 71 individuos.
- Los alelos L y S de *SLC6A4* en 267 individuos.

$$E4. \quad S = \text{Verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}) * 100$$

$$E5. \quad E = \text{Verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}) * 100$$

#### 4.3.3. Precisión en la determinación de los genotipos de *SLC6A4* e *IL-10*

La precisión (P) en la determinación de los genotipos de los genes *SLC6A4* e *IL-10* se calculó comparando los resultados de los genotipos obtenidos mediante *PHARMACHip*® y los obtenidos por análisis de fragmentos o secuenciación, respectivamente, utilizando la ecuación E6.

$$E6. \quad P = (\text{Genotipos correctos} / \text{Total de genotipos}) * 100$$

#### 4.4. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA PARA LA COMPARACIÓN CON NUESTRA POBLACIÓN. HAPMAP

Las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes incluidas en *PHARMACHip*® obtenidas en la población control se compararon con las descritas en la base de datos HapMap para la población caucásica CEU, constituida por residentes de Utah con origen ancestral del Norte y Oeste de Europa.

En el caso de frecuencias alélicas o genotípicas no reportadas en HapMap, y de las frecuencias de metabolizadores lentos (y ultra rápidos de *CYP2D6*), los datos de nuestra población control fueron comparados con datos de publicaciones científicas.

Para los genes *CYP2D6* y *NAT2*, debido al gran número de genotipos esperados por la naturaleza altamente polimórfica de estos dos genes, exclusivamente se compararon las frecuencias alélicas y de metabolizadores lentos (o ultra rápidos para *CYP2D6*).

La comparación de frecuencias alélicas, genotípicas y de metabolizadores lentos (y ultra rápidos para *CYP2D6*) entre la población española y la población control se realizó mediante los test  $\chi^2$  o Fisher, y el test de igualdad de proporciones para la comparación de los alelos de los genes *CYP2D6* y *NAT2*. Todos estos análisis se realizaron con el programa estadístico *R* versión 2.10.0.

## 4.5. SELECCIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS

### 4.5.1. Selección de las variantes genéticas para el estudio farmacogenético

Las variantes genéticas seleccionadas para el estudio farmacogenético fueron aquellas implicadas en la farmacocinética y farmacodinamia de la risperidona, descritas en las bases de datos PharmGKB y Pubmed, o potencialmente relacionadas (no descritas con anterioridad, en genes implicados en su mecanismo de acción) y variantes previamente asociadas a respuesta a risperidona (Pubmed) (*tabla M13*).

Gen	Nombre	Variante	Genotipado
<b>FARMACOCINÉTICA</b>			
<i>CYP2D6</i>	Citocromo P450 2D6	ML, MI, MN, MU	PHARMAChip®
<i>CYP3A4</i>	Citocromo P450 3A4	*1B	PHARMAChip®
<i>MDR1</i>	Glicoproteína P	3435 C>T	PHARMAChip®
<b>FARMACODINAMIA</b>			
<i>ADRA1</i>	Receptor α1 adrenérgico	-4884 A>G	D. alélica
		-4155 C>G	D. alélica
		-563 C>T	D. alélica
<i>DRD2</i>	Receptor D2 de dopamina	Taq1A	D. alélica
<i>DRD3</i>	Receptor D3 de dopamina	Ser9Gly	PHARMAChip®
<i>HTR2A</i>	Receptor 2A de serotonina	102 C>T	PHARMAChip®
		His452Tyr	PHARMAChip®
<i>HTR2C</i>	Receptor 2C de serotonina	-759 C>T	D. alélica
<b>OTROS</b>			
<i>ADRB1</i>	Receptor β1 adrenérgico	Arg389Gly	PHARMAChip®
<i>ADRB2</i>	Receptor β2 adrenérgico	Arg16Gly	PHARMAChip®
<i>BDNF</i>	Brain-derived neurotrophic factor	Val66Met	Secuenciación
<i>COMT</i>	Catecol-O-Metil transferasa	Val108Met	PHARMAChip®
<i>GRIN2B</i>	Subunidad 2B del receptor glutamatérgico NMDA	2667C>T	PHARMAChip®
<i>HTR1A</i>	Receptor 1A de serotonina	-1019 C>G	D. alélica
<i>HTR6</i>	Receptor 6 de serotonina	267 T>C	D. alélica
<i>SLC6A4</i>	Transportador de serotonina	Alelos L y S	PHARMAChip®

**Tabla M13.** Variantes genéticas seleccionadas para el estudio farmacogenético

Muchas de estas variantes estaban incluidas en *PHARMAChip®* y otras se determinaron mediante discriminación alélica o secuenciación (sección 3.3).

#### 4.5.2. Selección de las variantes genéticas para el estudio de asociación con esquizofrenia

Para el estudio de asociación con la esquizofrenia las variantes genéticas se seleccionaron de *PHARMAChip®*. La selección se apoyó en lo descrito en la base de datos *Schizophrenia Gene Resource (SZGR)* que dispone de un listado de genes como resultado de un meta-análisis de los estudios de asociación genética realizados en esquizofrenia (Allen et al., 2008) (*tabla M14*).

Gen	Nombre	Variante	Posición
<b>COMT</b>	Catecol-O-Metil transferasa	Val158Met	22q11.21-q11.23; 22q11.21
<b>CYP1A2</b>	Citocromo P450 1A2	*1F (rs762551)	15q24.1
<b>CYP2D6</b>	Citocromo P450 2D6	ML, MI, MN, MU	22q13.1
<b>DRD3</b>	Receptor D3 de dopamina	Ser9Gly (rs 6280)	3q13.3
<b>GRIN2B</b>	Subunidad 2B del receptor glutamatérgico NMDA	2664C>T (rs1806201)	12p12
<b>GSTM1</b>	Glutation-S-transferasa M1	Presente/Ausente	1p13.3
<b>GSTT1</b>	Glutation-S-transferasa T1	Presente/Ausente	22q11.23
<b>HTR2A</b>	Receptor 2A de serotonina	-102>C (rs1806201) His452Tyr (rs6314)	13q14-q21
<b>IL-10</b>	Interleucina 10	-1082G>A (rs1800896)	1q31-q32
<b>MTHFR</b>	Metilentetrahidrofolato reductasa	677C>T (rs1801133)	1p36.3
<b>SLC6A4</b>	Transportador de serotonina	(S/L) (rs4795541)	17q11.1-q12
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$	-308C>T (rs1800629)	6p21.3

**Tabla M14.** Variantes genéticas seleccionadas para el estudio de asociación con la esquizofrenia

#### 4.6. DESARROLLO DEL ESTUDIO FARMACOGENÉTICO (*Figura M1*)

El estudio farmacogenético consistió en un estudio de asociación de las variantes genéticas descritas en la *tabla M13* con:

- La presencia de efectos adversos secundarios a risperidona, según la escala UKU (estudio de seguridad).
- La mejoría clínica debida al tratamiento con risperidona, medida como cambio porcentual durante el ingreso en la escala PANSS (estudio de eficacia).

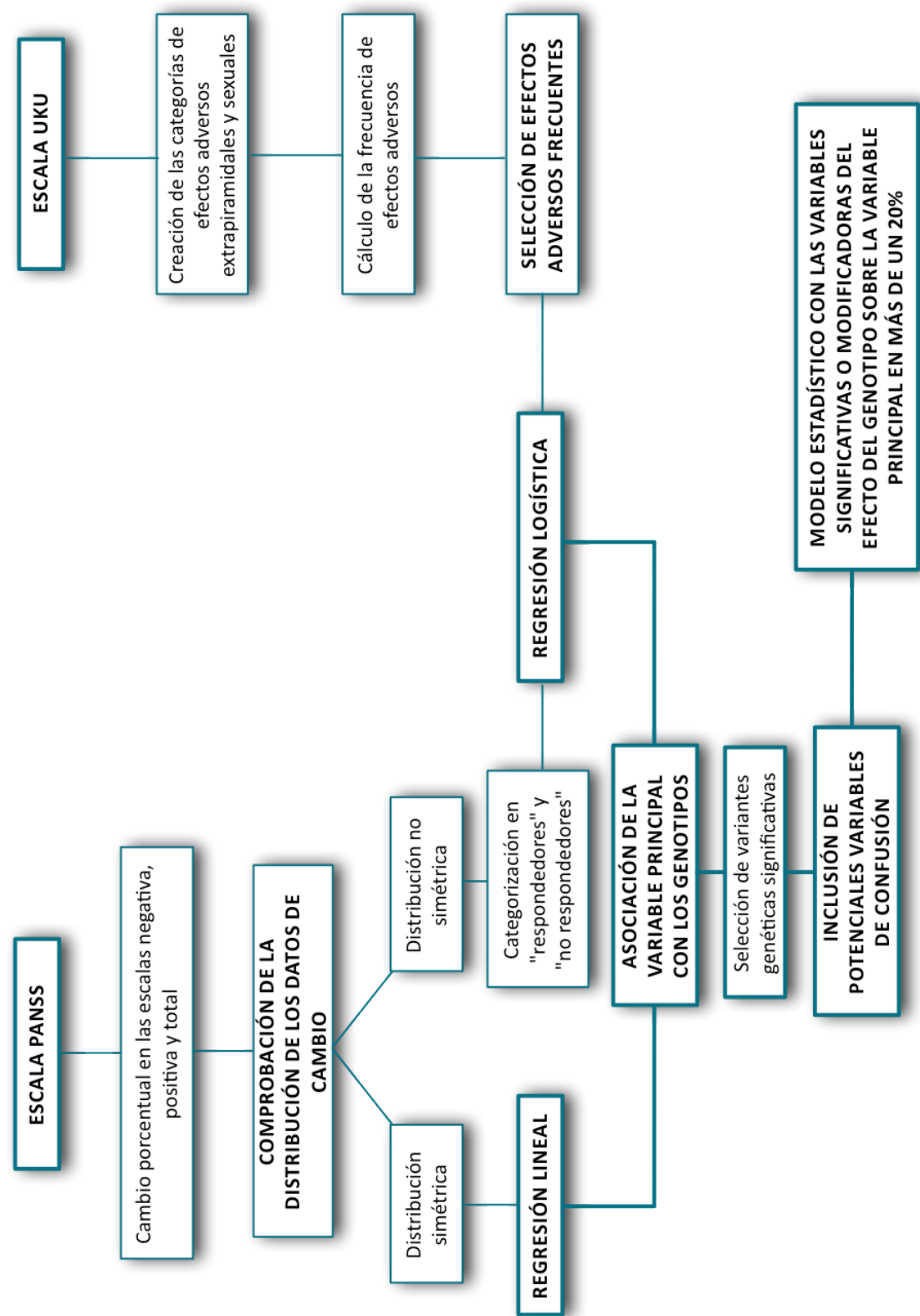
La asociación de la variable principal, aparición de efectos adversos o cambio en la escala PANSS, con las variantes genéticas se realizó mediante regresión logística o lineal en función del caso. Las variantes genéticas se estudiaron según el modelo genético codominante en todos los casos excepto en *HTR2C*, que al estar localizado en el cromosoma X, se utilizó el modelo dominante.

Una vez seleccionadas las variantes genéticas significativamente asociadas a la variable respuesta ( $p \leq 0,050$ ), se evaluó el posible efecto de confusión que pudieran tener las variables demográficas y clínicas (edad, sexo, dosis de risperidona, tiempo de ingreso y tratamientos concomitantes) en la asociación observada. Este efecto se evaluó por separado para cada una de las variables, de manera secuencial. De este modo todas aquellas variables que se asociaron significativamente a la respuesta ( $p \leq 0,050$ ) o modificaron en más de un 20% el efecto que el genotipo tenía sobre la misma, se seleccionaron para construir un modelo estadístico con el menor número de variables necesarias para explicar el efecto del genotipo sobre el fenotipo estudiado.

En ambos estudios, el análisis estadístico se realizó con el programa *STATA 10.0*.



Figura M1. Desarrollo del estudio farmacogenético



#### 4.6.1. Estudio farmacogenético de seguridad de risperidona

La variable dependiente del estudio fue la presencia de efectos adversos según la escala UKU. Por lo tanto, los pacientes seleccionados para este estudio fueron aquellos en tratamiento con risperidona con registro de esta escala.

A partir de los efectos adversos de la escala UKU, con el objetivo de agrupar aquellos efectos con un posible origen similar, se crearon las siguientes categorías de efectos:

- **Efectos adversos extrapiramidales (SEP)** a partir de los “efectos adversos neurológicos” temblor, rigidez, hipocinesia, hipercinesia y acatisia.
- **Efectos adversos sexuales** a partir de “otros efectos adversos” disminución de la libido, disfunción eréctil, disfunción eyaculatoria, disfunción orgásmica y sequedad vaginal.

La frecuencia de pacientes con cada efecto adverso se calculó como el número de pacientes con presencia del efecto con una puntuación de “1”, “2” ó “3”, entre el total de pacientes evaluados. Además, se calculó la frecuencia de efectos adversos según las 6 categorías definidas (las 4 de la UKU y las de SEP y efectos adversos sexuales), como la presencia de, al menos, uno de los efectos adversos en cada una de las categorías.

Una vez calculada la frecuencia de los efectos adversos, se seleccionaron los más frecuentes entre los pacientes esquizofrénicos para el estudio farmacogenético. La frecuencia a partir de la cual se consideró un efecto adverso frecuente fue el 10% (los clasificados como muy frecuentes según MedDRA Frequency Convention).

La asociación de estos efectos adversos con las variantes genéticas se realizó mediante regresión logística en la que se evaluó el efecto de los genotipos, medido como OR y su intervalo de confianza del 95% (IC95%), según el modelo codominante, en la aparición del efecto, y a continuación, se controló ese efecto por las variables demográficas y clínicas.

#### 4.6.2. Estudio de eficacia de risperidona

Para este estudio se seleccionaron aquellos pacientes en tratamiento con risperidona con puntuación de la escala PANSS al ingreso y al alta. Así, como variable respuesta se

empleó el cambio porcentual durante el ingreso de esta escala, que se calculó como se muestra en la *ecuación E7*.

$$E7. \quad \% \text{ de cambio} = [(Puntuación \text{ al ingreso} - Puntuación \text{ al alta}) / Puntuación \text{ al ingreso}] * 100$$

La escala PANSS está compuesta a su vez por las escalas negativa, positiva y de fisiopatología general. Por lo tanto, se calculó primero la puntuación total de cada una de ellas al ingreso y al alta y con éstas, la puntuación total de la escala (la suma de las tres -PANSS total-). Para las escalas negativa (PANSS-N), positiva (PANSS-P) y total (PANSS-T) se calculó el porcentaje de cambio, la media de los datos ( $\pm$ SD) y se comprobó la simetría de la distribución. Así, en el caso de no ajustarse, se categorizó la variable para el análisis estadístico.

De este modo, para las escalas PANSS-N y PANSS-P, cuya distribución fue asimétrica, los pacientes se clasificaron como 'respondedores' y 'no respondedores' en función de que el cambio porcentual fuera mayor o menor del 40%, respectivamente (Xuan et al., 2008). Fue así como se evaluó la asociación, mediante regresión logística, de la respuesta de la sintomatología negativa y positiva con las variantes genéticas.

En el caso de PANSS-T, se evaluó la diferencia en la media de cambio en los diferentes genotipos mediante regresión lineal.

En todos los casos, se controló el efecto del genotipo sobre el cambio en las escalas por las posibles variables de confusión, demográficas y clínicas.

#### **4.7. DISEÑO DEL ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON ESQUIZOFRENIA. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES**

Con todos los pacientes y los controles se realizó un estudio de asociación con la esquizofrenia en dos partes:

- Estudio de asociación con variantes genéticas incluidas en *PHARMAChip®* potencialmente implicadas en la esquizofrenia (SZGR).
- Estudio de asociación de los haplotipos del promotor del gen *IL-10* con la esquizofrenia.

En ambos estudios se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles, de manera global y estratificando la población por el sexo, que fue evaluado como posible factor de riesgo para la esquizofrenia. Esta comparación se realizó mediante el test  $\chi^2$  y como medida de la fuerza de la asociación de la variante genética con la enfermedad se determinó el OR y su IC95%.

#### **4.7.1. Estudio de asociación de las variantes genéticas seleccionadas de PHARMAChip® con la esquizofrenia**

Las frecuencias alélicas y genotípicas (o fenotípicas en el caso de *CYP2D6*) de las variantes de la *tabla M14* se compararon entre casos y controles de manera global y estratificando por el sexo. Para la comparación de las frecuencias genotípicas se agruparon los genotipos según el modelo genético codominante para todos los genes excepto *GSTM1* y *GSTT1* para los cuales se empleó el modelo recesivo, ya que *PHARMAChip®* proporcionó los resultados de genotipo directamente de esta manera (“ausente” se refería a la delección del alelo en homocigosis y “presente” a la presencia al menos de un alelo).

#### **4.7.2. Estudio de asociación de los haplotipos del promotor del gen *IL-10* con la esquizofrenia**

En la segunda parte del estudio, se determinaron los haplotipos del promotor del gen *IL-10* formados por las variantes -1082 G>A, -819 C>T y -592 C>A que en caucásicos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, (GCC, ACC y ATA) y se compararon en casos y controles, de manera global y estratificados por sexo.

Para ello, se determinó la variante de la posición -592 mediante discriminación alélica (sección 3.3.3.) en pacientes y controles, y se dedujo el haplotipo a partir de las dos posiciones determinadas (-1082 y -592) (Ortiz et al., 2006).

A continuación se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs y los haplotipos y se compararon mediante el test  $\chi^2$  o el test de igualdad de proporciones entre casos y controles, sin estratificar y estratificados por sexo. De nuevo, como medida de la fuerza de la asociación se usó el OR (y su IC95%).

## 4.8. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

### 4.8.1. Programas informáticos

- Primer3 versión 4.0.: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- R.2.10.0.: R Project for Statistical Computing: [cran.r-project.org/](http://cran.r-project.org/)

### 4.8.2. Bases de datos consultadas

- Consensus Human Arylamine N-Acetyltransferase Gene Nomenclature: <http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/>
- Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee: [www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se)
- NCBI Variation DataBase: [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)
- PubMed: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)
- Schizophrenia Gene Resource (SZGR): <http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/>
- Schizophrenia Gene DataBase: [www.szgene.org/](http://www.szgene.org/)
- The International HapMap Project: [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)
- The Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)

*Objetivos*

La farmacogenética se presenta como una herramienta con potencial capacidad de identificar a aquellos pacientes que pueden beneficiarse de un determinado tratamiento de los que no y a aquellos en riesgo de desarrollar efectos adversos. De especial utilidad es esta disciplina en el tratamiento antipsicótico, que presenta una gran variabilidad interindividual y una alta tasa de abandono debido a la falta de eficacia o al desarrollo de toxicidad.

En base a esto, los objetivos de esta tesis fueron:

## **1. Objetivo principal**

Evaluar la utilidad de la farmacogenética en la predicción de la respuesta a risperidona, en el contexto normal de politerapia en pacientes con un episodio agudo de esquizofrenia, mediante la asociación de variantes genéticas implicadas en el mecanismo de acción o metabolismo de risperidona, incluidas en *PHARMAChip*® o descritas en las bases de datos, con la eficacia y la aparición de efectos adversos derivados del tratamiento.

## **2. Objetivos secundarios**

**2.1.** Evaluar si el uso de *PHARMAChip*® puede ser una buena alternativa al análisis manual de los marcadores genéticos incluidos, mediante la determinación de sus características analíticas, para su posible implantación en la práctica clínica.

**2.2.** Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes incluidas en *PHARMAChip*® en población control española y compararlas con las descritas en población caucásica.

**2.3.** Describir la frecuencia de metabolizadores lentos y ultra rápidos para las principales enzimas metabolizadoras de fármacos de fase I y de fase II, en población control española.

**2.4.** Evaluar si alguno de los marcadores genéticos incluidos en el chip se encuentra asociado al desarrollo de esquizofrenia, mediante la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de aquellos genes susceptibles de estar implicados en la etiología de la enfermedad, entre los pacientes esquizofrénicos y un grupo control.





## *Resultados*

## **1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

De los 245 pacientes reclutados se tomaron datos demográficos y clínicos para evaluarlas como potenciales variables de confusión en el estudio farmacogenético de seguridad y eficacia de la risperidona. Los datos demográficos y clínicos se obtuvieron de manera retrospectiva, por lo tanto, el tamaño muestral de los pacientes incluidos en los tres estudios realizados en este trabajo (farmacogenético de seguridad, farmacogenético de eficacia y de asociación caso-control con la esquizofrenia) varió en función de los criterios establecidos en cada caso y de la disponibilidad de los datos.

A continuación se describen los datos demográficos obtenidos para el total de pacientes reclutados (n=245 individuos) y para los pacientes tratados con risperidona (n=219) y los datos clínicos obtenidos para estos últimos.

### **1.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS**

La edad y el sexo fueron utilizados como potenciales variables de confusión en el estudio farmacogenético de seguridad y eficacia, y el sexo además se evaluó como factor de riesgo de esquizofrenia en el estudio de asociación caso-control.

#### **1.1.1. Edad**

La edad se obtuvo en 238 pacientes (hubo 7 valores perdidos) y la media ( $\pm$ SD) fue de  $45\pm 13$  años y con un rango de edad comprendido entre los 19 y los 83 años.

Como la edad de los pacientes no se ajustó a una distribución normal, esta variable se categorizó, en los 219 pacientes en tratamiento con risperidona, en tres intervalos de amplitud aproximada de 20 años (3 valores perdidos; *tabla R1*). Así fue como se incluyó como covariable en el estudio farmacogenético.

#### **1.1.2. Sexo**

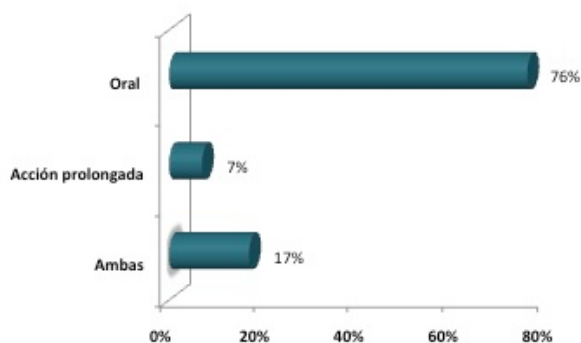
En cuanto al sexo, hubo más hombres que mujeres reclutados, con 157 hombres (63,9%) vs. 88 mujeres (36,1%).

## 1.2. VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas se obtuvieron exclusivamente de los 219 pacientes en tratamiento con risperidona, ya que éstas iban a ser evaluadas como potenciales factores de confusión en el estudio farmacogenético de seguridad y eficacia de risperidona.

### 1.2.1. Dosis de risperidona

Los 219 pacientes recibieron risperidona en dos formas farmacéuticas diferentes, oral e intramuscular de acción prolongada. Así, hubo pacientes tratados exclusivamente con risperidona oral (n=167), otros con ambas (n=36) y un tercer grupo al cual se le administró únicamente risperidona de acción prolongada (n=16) (*gráfico R1*).



**Gráfico R1.**  
*Distribución de  
pacientes tratados  
con las dos  
formas  
farmacéuticas de  
risperidona*

La media ( $\pm$ SD) de las dosis de risperidona oral que recibieron los pacientes fue de  $8,4 \pm 3,2$  mg (rango comprendido entre 3 y 18 mg). Debido a que las dosis no se ajustaban a una distribución normal, se categorizó esta variable, en tres intervalos, según los terciles de la distribución de los datos (*tabla R1*).

De manera similar, las dosis de risperidona intramuscular (25 mg, 37,5 mg, 50 mg 75 ó 100 mg) se agruparon en las siguientes categorías: 0 mg; <50 mg y >50 mg (*tabla R1*).

### 1.2.2. Tiempo de ingreso

El tiempo de ingreso se tomó de manera retrospectiva y se obtuvieron 132 datos, cuya media ( $\pm$ SD) fue  $13 \pm 9$  días. También esta variable, al no ajustarse a una distribución normal, se categorizó a partir de la mediana de los datos (12 días; rango de 1 a 48 días) en dos intervalos (*tabla R1*).

Variable	Categorías	N (%)
Edad	<40 años	79 (36,6%)
	40-59 años	106 (49,1%)
	>59 años	31 (14,3%)
Dosis oral	≤6 mg/día	53 (41,4%)
	6-9 mg/día	43 (33,6%)
	≥9 mg/día	32 (25,0%)
Dosis intramuscular	0 mg	167 (81,8%)
	<50 mg	16 (7,8%)
	≥50 mg	21 (10,2%)
Tiempo de ingreso	≤12 días	72 (54,5%)
	>12 días	60 (45,5%)

**Tabla R1.**  
*Frecuencia de pacientes según las distintas categorías de las variables demográficas y clínicas*

### 1.2.3. Tratamientos concomitantes

Debido a la heterogeneidad de fármacos, los tratamientos se agruparon según el grupo farmacológico en anticolinérgicos, antidepresivos, antiepilépticos, antipsicóticos clásicos y atípicos, benzodiazepinas y litio (*tabla R2*)

Tratamientos	N (%)
Anticolinérgicos	36 (16,4%)
Antidepresivos	29 (13,2%)
Antiepilépticos	26 (11,9%)
Antipsicóticos atípicos	19 (8,7%)
Antipsicóticos clásicos	38 (17,3%)
Benzodiazepinas	84 (38,3%)
Litio	4 (2,2%)

**Tabla R2.**  
*Tratamientos concomitantes según el grupo farmacológico*

La información sobre la medicación concomitante al tratamiento con risperidona se obtuvo en todos los pacientes (*anexo 3*).

Fue así, como variables categóricas, como se investigó su papel como potenciales factores de confusión en el estudio farmacogenético de seguridad y eficacia.

#### 1.2.4. Efectos adversos

111 pacientes en tratamiento con risperidona fueron evaluados con la escala UKU. En ellos se calculó la frecuencia de los 48 efectos adversos de la escala y de las seis categorías, las 4 definidas en la UKU y la de SEP y efectos adversos sexuales. El resultado fue que de los 111 pacientes incluidos, 101 (91%), presentaron al menos un efecto adverso derivado del tratamiento con risperidona en cualquiera de las 4 categorías de la UKU, un 79,3% presentaron efectos adversos psíquicos, 39,6% neurológicos, 70,2% autonómicos, 66,7% “otros efectos adversos” (*tabla R3*), 36% (n=40) SEP y 22,5% (n=25) sexuales.

De la escala UKU, los efectos adversos con una frecuencia mayor del 10% en los pacientes se muestran en la *tabla R4*.

Efecto adverso	Frecuencia
Somnolencia/Sedación	56,7%
Astenia/Laxitud/Fatigabilidad	37,8%
Aumento de las horas de sueño	36%
Ganancia de peso	36%
Efectos extrapiramidales	34,2%
Dificultad de concentración	34,2%
Estreñimiento	32,4%
Poliuria/Polidipsia	28,8%
Disminución de la salivación	24,3%
Fallos de memoria	23,4%
Efectos sexuales	22,5%
Mareos/Hipotensión ortostática	21,6%
Aumento de la salivación	21,6%
Dolor de cabeza	18,9%
Tensión /Inquietud interna	17,1%
Disminución de la libido	17,1%
Depresión	14,4%
Aumento de los sueños	14,4%
Dependencia física a fármacos	14,4%
Problemas de acomodación	13,5%
Hipocinesia/Acinesia	12,6%
Temblor	12,6%
Dependencia psíquica a fármacos	12,6%
Acatisia	10,8%

**Tabla R4**  
**Efectos adversos con**  
**frecuencia ≥10%**

	Severidad (n)			Frecuencia
	1	2	3	n (%)
<b>PSÍQUICOS</b>				<b>88 (79,3%)</b>
Dificultad de concentración	20	14	4	38 (34,2%)
Astenia/Laxitud/Fatigabilidad	18	15	9	42 (37,8%)
Somnolencia/Sedación	30	20	13	63 (56,7%)
Fallos de memoria	17	6	3	26 (23,4%)
Depresión	15	1	0	16 (14,4%)
Tensión /Inquietud interna	15	3	1	19 (17,1%)
Aumento de las horas de sueño	24	18	8	40 (36%)
Disminución de horas de sueño	4	2	2	8 (7,2%)
Aumento de los sueños	5	5	6	16 (14,4%)
Indiferencia emocional	5	5	1	11 (9,9%)
<b>NEUROLÓGICOS</b>				<b>44 (39,6%)</b>
Distonía	0	0	2	2 (1,8%)
Rigidez	7	3	1	11 (9,9%)
Hipocinesia/Acinesia	8	5	1	14 (12,6%)
Hipercinesia	4	1	0	5 (4,5%)
Temblor	10	2	2	14 (12,6%)
Acatisia	9	3	0	12 (10,8%)
Parestesias	7	2	2	11 (9,9%)
Crisis epilépticas	0	0	0	0 (0%)
<b>AUTONÓMICOS</b>				<b>78 (70,2%)</b>
Problemas de acomodación	6	2	7	15 (13,5%)
Aumento de la salivación	9	9	6	24 (21,6%)
Disminución de la salivación	11	14	2	27 (24,3%)
Náuseas/Vómitos	5	1	0	6 (5,4%)
Diarrea	2	1	1	4 (3,6%)
Estreñimiento	19	8	9	36 (32,4%)
Problemas en la micción	4	5	2	11 (9,9%)
Poliuria/Polidipsia	11	16	6	32 (28,8%)
Mareos/Hipotensión ortostática	17	6	1	24 (21,6%)
Palpitación/Taquicardia	5	1	1	7 (6,3%)
Aumento de la sudoración	7	0	1	8 (7,2%)
<b>OTROS</b>				<b>74 (66,7%)</b>
Erupciones	2	1	0	3 (2,7%)
Picor	4	1	0	5 (4,5%)
Fotosensibilidad	2	0	2	4 (3,6%)
Aumento de la pigmentación	1	0	0	1 (0,9%)
Ganancia de peso	26	12	2	40 (36%)
Pérdida de peso	8	1	0	9 (8,1%)
Menorragia	1	3	0	4 (3,6%)
Amenorrea	3	0	0	3 (2,7%)
Galactorrea	0	2	0	2 (1,8%)
Ginecomastia	1	0	0	1 (0,9%)
Aumento de la libido	6	3	0	9 (8,1%)
Disminución de la libido	8	8	3	19 (17,1%)
Disfunción eréctil	3	0	1	4 (3,6%)
Disfunción eyaculatoria	3	1	2	6 (5,4%)
Disfunción orgásmica	3	1	0	4 (3,6%)
Sequedad vaginal	2	1	0	3 (2,7%)
Dolor de cabeza	17	3	1	21 (18,9%)
Dependencia física a fármacos	5	7	4	16 (14,4%)
Dependencia psíquica a fármacos	3	6	5	14 (12,6%)

**Tabla R3.** Frecuencia de efectos adversos según la escala UKU. “1”, “2” y “3” se corresponde con los diferentes grados de severidad que pueden presentar los efectos adversos

### 1.2.5. Escala PANSS

El cambio porcentual durante el ingreso en la escala PANSS fue la variable respuesta del estudio farmacogenético de eficacia de risperidona.

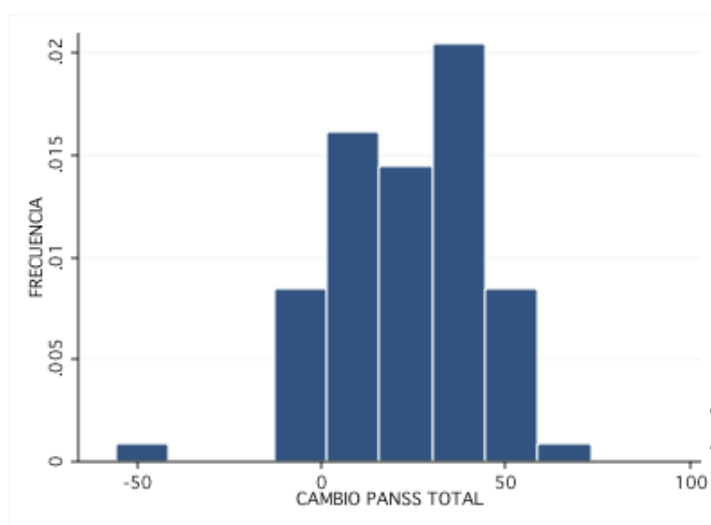
Los datos de esta escala se obtuvieron para 76 de los 219 pacientes tratados con risperidona, en los que se calculó la puntuación total al ingreso y al alta de las escalas negativa (PANSS-N), positiva (PANSS-P) y total (PANSS-T) y con éstas, el cambio porcentual (*ecuación E7*, “Material y Métodos” sección 4.6.2). Además, en las tres, se calculó la media ( $\pm$  SD) (*tabla R5*) y la simetría de la distribución de los datos (*gráficos R2a, R2b y R2c*).

Escala	Media	SD	Rango
CAMBIO PANSS-N	8,21%	39,7	-187,5-70,8
CAMBIO PANSS-P	31,1%	26,5	-71,4-80,6
CAMBIO PANSS-T	23,6%	20,3	-55,8-73,1

**Tabla R5.** Media, SD y rango de los cambios porcentuales de las tres escalas de PANSS

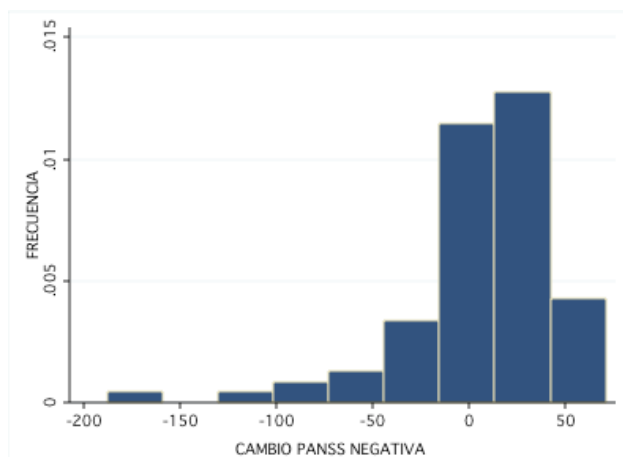
Tal y como se muestra en la *tabla R5*, en las tres escalas hubo valores positivos y negativos en función de que hubiera o no mejoría en el paciente, respectivamente

Como puede observarse en el *gráfico R2a*, los datos de PANSS-T se distribuyeron de manera relativamente simétrica.

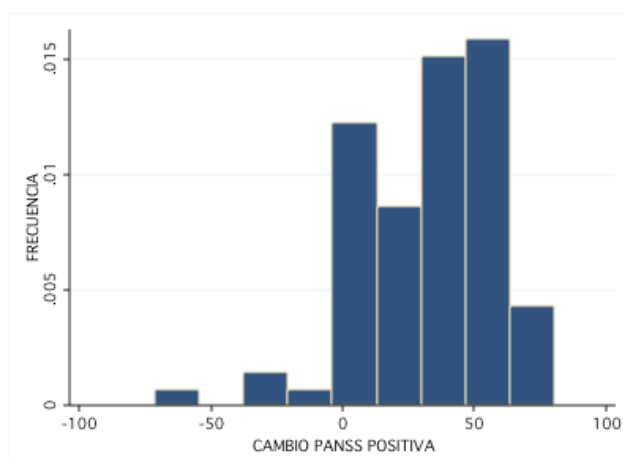


**Gráfico R2a.** Histograma de los datos de cambio porcentual en la escala total de PANSS

Esto no ocurrió, en cambio, con los datos de las escalas PANSS-N y PANSS-P (gráficos R2b y R2c), por lo que ambas se categorizaron en dos grupos para evaluar su posible asociación con las variantes genéticas seleccionadas (tabla R6).



**Gráfico R2b.** Histograma de los datos de cambio porcentual en la escala negativa de PANSS



**Gráfico R2c.** Histograma de los datos de cambio porcentual en la escala positiva de PANSS

Los grupos de pacientes según el cambio de las escalas PANSS-N y PANSS-P fueron:

- Pacientes 'respondedores': cambio  $\geq 40\%$ .
- Pacientes 'no respondedores': cambio  $< 40\%$ .

Grupo de pacientes	PANSS-N n (%)	PANSS-P n (%)
'Respondedores'	12 (15,8%)	34 (44,7%)
'No respondedores'	64 (84,2%)	42 (55,3%)

**Tabla R6.** Distribución de pacientes respondedores y no respondedores de las escalas PANSS negativa y positiva



### 1.3. VARIANTES GENÉTICAS

Las variantes genéticas estudiadas en este trabajo fueron seleccionadas de *PHARMAChip®* y de las bases de datos, según se describe en la sección 4.5 de “Material y Métodos”.

#### 1.3.1. Variantes genéticas incluidas en *PHARMAChip®*

Para todas las variantes incluidas en *PHARMAChip®* se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes. Todas ellas, excepto la variante Arg16Gly del gen *ADRB2*, cumplían el EHW.

Los resultados de las frecuencias alélicas y genotípicas se encuentran en el *Anexo 4*.

#### 1.3.2. Resto de las variantes

El resto de las variantes estudiadas en este trabajo se determinaron exclusivamente en los pacientes incluidos en los estudios farmacogenético de seguridad y de eficacia (n=191) (*tabla R7*).

Variante	Alelos n (p)		Genotipos n (p)		
	A	B	AA	AB	BB
<i>ADRA1 -563C&gt;T</i>	161 (0,421)	221 (0,589)	31 (0,162)	99 (0,518)	61 (0,320)
<i>ADRA1 -4155C&gt;G</i>	193 (0,505)	189 (0,495)	50 (0,262)	93 (0,487)	48 (0,251)
<i>ADRA1 -4884A&gt;G</i>	65 (0,174)	309 (0,826)	8 (0,043)	49 (0,260)	130 (0,695)
<i>BDNF Val66Met</i>	283 (0,773)	83 (0,227)	112 (0,612)	59 (0,322)	12 (0,065)
<i>DRD2 Taq1A</i>	80 (0,210)	302 (0,790)	11 (0,057)	58 (0,304)	122 (0,639)
<i>HTR1A -1019C&gt;G</i>	175 (0,460)	205 (0,540)	43 (0,226)	89 (0,453)	58 (0,305)
<i>HTR2C -759C&gt;T</i>	175 (0,460)	205 (0,540)	144 (0,758)	28 (0,147)	18 (0,095)
<i>HTR6 267C&gt;T</i>	325 (0,851)	57 (0,149)	142 (0,743)	41 (0,215)	8 (0,042)

**Tabla R7.** Frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes no incluidas en *PHARMAChip®*.

*n*=frecuencia absoluta; *p*=frecuencia relativa (tanto por 1). *A*=alelo silvestre; *B*=alelo mutado; *AA*, *AB*, *BB*= genotipos resultantes de la combinación de *A* y *B*. Para *HTR2C*, *AA*=alelo *A* en homo o hemicigosis y *BB*=alelo *B* en homo o hemicigosis.

Las variantes -4884A>G de *ADRA1*, Val66Met de *BDNF* y -759C>T de *HTR2C* no pudieron determinarse en todos los pacientes, con 4, 8 y 1 fallos respectivamente, debido a la mala calidad de la muestra de ADN y a la imposibilidad de obtener una nueva.

Para todas aquellas variantes determinadas por discriminación alélica se comprobó la veracidad de los datos obtenidos mediante secuenciación en 30 pacientes seleccionados de manera aleatoria. Los resultados de la secuenciación demostraron una concordancia entre los dos métodos del 100% en todos los casos excepto en la variante -1019C>G de *HTR1A* que fue del 94%.

Se comprobó también que todas las variantes genéticas cumplían el EHW.

## **2. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE PHARMAChip®**

Las características de PHARMAChip® evaluadas en este trabajo fueron la tasa de genotipado, la sensibilidad y especificidad en la determinación de los genes *CYP2D6* y *SLC6A4*, la precisión en la identificación de los genotipos de *IL-10* y *SLC6A4* y el tiempo de espera de los resultados y de manipulación.

### **2.1. TASA DE GENOTIPADO**

El genotipado con PHARMAChip® se realizó en la empresa *Progenika Biopharma* en la totalidad de los controles (n=437) y en 232 pacientes, ya a que el ADN de 13 de éstos no cumplía los criterios de calidad establecidos por la empresa (2 µg en un mínimo de 50 µL).

#### **2.1.1. Tasa de genotipado del total de muestras**

En 12 de las 681 muestras enviadas a *Progenika* no se obtuvo resultado de ningún genotipo, por lo que la tasa de éxito de genotipado fue del 98,2% de las muestras.

Estas muestras se intentaron genotipar de nuevo sin éxito.

#### **2.1.2. Tasa de genotipado del total de genotipos.**

En total, no se recibió resultado de 98 genotipos, debido a dos causas: el fallo en el proceso de genotipado (resultado proporcionado por *Progenika* como *no call* -no señal de genotipado-) o por la “presencia de variantes genéticas raras” no incluidas en PHARMAChip® (*undetermined*).

Los fallos de genotipado se observaron en 73 casos con los VNTR de los promotores de *UGT1A1* y *SLC6A4* las variantes más frecuentemente afectadas, con 15 y 17 fallos respectivamente (*tabla R8*). Por otro lado, las “variantes raras” fueron frecuentes en los genes *CYP1A2* (9 casos), *CYP2D6* (13 casos) y *NAT2* (3 casos) (*tabla R8*).

La tasa global de éxito de genotipado fue, por lo tanto, del 99,6%.

Gen	Variantes raras	No señal
<i>CYP1A2</i>	9	0
<i>CYP2C19</i>	0	4
<i>CYP2D6</i>	13	8
<i>CYP3A4</i>	0	6
<i>GSTT1</i>	0	3
<i>NAT2</i>	3	3
<i>TPMT</i>	0	3
<i>UGT1A1</i>	0	15
<i>MDR1</i>	0	2
<i>SLC6A4</i>	0	17
<i>ADRB1</i>	0	3
<i>BCHE</i> (atípica)	0	2
<i>BCHE</i> (variante K)	0	1
<i>COMT</i>	0	2
<i>IL-10</i>	0	1
<i>TYMS</i>	0	3

Tabla R8.

*Genes para los cuales no se obtuvo el total de los genotipos y número de fallos debidos a cada causa*

## 2.2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE *PHARMACHIP*®

Con el objetivo de evaluar *PHARMACHIP*® como herramienta para el genotipado en farmacogenética y su implantación en la práctica clínica, se determinó su sensibilidad y especificidad para los genes *CYP2D6* y *SLC6A4*.

Para *CYP2D6* la sensibilidad y especificidad se evaluó respecto a la presencia o ausencia de los alelos \*3, \*4, \*5, \*6, \*9, \*10 y las duplicaciones del gen, \*1XN y \*2XN (tabla R9). Excepto para el alelo \*5, cuya sensibilidad fue del 83,3%, los valores de sensibilidad y especificidad estuvieron comprendidos entre el 98 y el 100%.

De manera análoga se evaluaron estos parámetros para la presencia o ausencia del alelo L (alelo largo, inserción de 44 pares de bases) en el gen *SLC6A4* con resultados de sensibilidad y especificidad de 96,5% y 97,9%, respectivamente.

### 2.3. PRECISIÓN EN LA DETECCIÓN DE LOS GENOTIPOS

La precisión de *PHARMAChip*® se determinó en términos de la correcta identificación de los genotipos de los genes *SLC6A4* e *IL-10*. Para el gen *SLC6A4*, de los 267 individuos evaluados hubo discrepancias en 15 de ellos. Para resolverlas, se utilizó la secuenciación como *Gold Standard* y se consideró como resultado correcto el obtenido por el análisis de fragmentos. En el caso de *IL-10* se secuenciaron 100 individuos y se encontraron 2 discrepancias de genotipos. Por lo tanto, la precisión de *PHARMAChip*® para la correcta identificación de los genotipos de *SLC6A4* e *IL-10* fue de 94,8% y 98% respectivamente.

Alelo	N	S	N1	E	N2
<i>CYP2D6</i> *3	142	100%	1/1	100%	141/141
<i>CYP2D6</i> *4	310	98,4%	62/63	100%	247/247
<i>CYP2D6</i> *5	142	83,3%	5/6	100%	136/136
<i>CYP2D6</i> *6	310	100%	4/4	99,7%	305/306
<i>CYP2D6</i> *9	142	100%	3/3	100%	139/139
<i>CYP2D6</i> *10	168	100%	8/8	100%	160/160
<i>CYP2D6</i> *1XN, *2XN	142	100%	8/8	100%	134/134
<i>SLC6A4</i> *L	534	96,5%	276/286	97,9%	243/248

**Tabla R9.** Sensibilidad y especificidad de *PHARMAChip*® para *CYP2D6* y *SLC6A4*. S: Sensibilidad; E: Especificidad; N: N° total de alelos determinados; N1: verdaderos positivos/(verdaderos positivos+falsos negativos); N2: verdaderos negativos/(verdaderos negativos+falsos positivos).

La *tabla R10* recoge las características analíticas determinadas en *PHARMAChip*®.

#### CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE *PHARMAChip*®

Tasa de éxito de genotipado de muestras	97,3%
Tasa de éxito de genotipado global	99,6%
Sensibilidad ( <i>CYP2D6</i> , <i>SLC6A4</i> )	83-100%
Especificidad ( <i>CYP2D6</i> , <i>SLC6A4</i> )	98-100%
Precisión ( <i>SLC6A4</i> , <i>IL-10</i> )	94,8-98%
Tiempos de espera	3 semanas
Manipulación	Mínimo

**Tabla R10.** Características analíticas determinadas en *PHARMAChip*®

### 3. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES INCLUIDAS EN *PHARMAChip*® Y DE METABOLIZADORES LENTOS DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS EN LA POBLACIÓN CONTROL ESPAÑOLA

Con los 437 controles genotipados en *Progenika* se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes incluidas en *PHARMAChip*® y se compararon con las descritas en población caucásica de HapMap (CEU) o en PubMed. Además se calculó la frecuencia de metabolizadores lentos para las principales enzimas metabolizadoras de fármacos (y de ultrarrápidos para CYP2D6).

#### 3.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE REFERENCIA (*tabla R11*)

Las frecuencias alélicas encontradas en nuestra población no mostraron, en la mayoría de los casos, diferencias con la población utilizada como referencia. Excepciones a esto fueron el alelo \*2 del *CYP2D6*, la variante “Ausente/Presente” del gen *GSTP1*, los alelos \*6A, \*6B, \*7B, \*12A, \*13 y \*14A del gen *NAT2* y el alelo \*28 de *UGT1A1* y las variantes estudiadas en *MDR1*, *IL-10* y *TNF $\alpha$*  en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas al compararlas con las poblaciones de referencia ( $p \leq 0,050$ ). Además, la variante IVS14+1G>A en el gen *DYPD* no se encontró en nuestra población.

#### 3.2. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS. COMPARACIÓN CON LA POBLACIÓN DE REFERENCIA (*tabla R12*)

Para los genotipos, también se calcularon las frecuencias de los 437 controles y se compararon con las poblaciones utilizadas como referencia. Además, se verificó el cumplimiento del EHW y se comprobó que todas las variantes, excepto la variante Arg16Gly en el gen *ADRB2*, lo cumplían.

Al igual que en el caso de los alelos, prácticamente no hubo diferencias en las frecuencias genotípicas en nuestra población al compararlas con la de referencia, excepto para *CYP1A2*, *IL-10* y *TNF $\alpha$* .

# FRECUENCIAS ALÉLICAS

Gen	Alelo	N	Frecuencia	Referencia	P valor	Población (n)
<b>METABOLISMO DE FASE I (CITOCROMO P-450)</b>						
<i>CYP1A1</i>	*1	840	0,961	0,981	0,173	Norteamericana (2n=362) (Wenzlaff et al., 2005)
	*2B	34	0,039	0,019		
<i>CYP1A2*</i>	*1	273	0,317	0,308	0,865	CEU HapMap (2n=240)
	*1C	578	0,672	0,692		
	*1F	9	0,010	0,011		
<i>CYP2B6</i>	516C	629	0,720	0,730	0,820	CEU HapMap (2n=226)
	516T	245	0,280	0,270		
<i>CYP2C19</i>	*1	751	0,863	0,864	0,398	Caucásica (2n=546) (Luo, Poland, Lin, & Wan, 2006)
	*2	115	0,132	0,127		
	*4	3	0,003	0,009		
	*8	1	0,001	0,000		
	*10	0	0,000	NI		
<i>CYP2C8</i>	*1	695	0,795	0,770	0,281	Española (2n=710) (Martinez et al., 2005)
	*2	4	0,004	NI		
	*3	130	0,149	0,710		
	*4	45	0,051	NI		
<i>CYP2C9</i>	*1	679	0,777	0,766	0,563	Española (2n=2152) (Sanchez-Diz et al., 2009)
	*2	123	0,141	0,156		
	*3	71	0,081	0,078		
	*6	1	0,001	NI		
<i>CYP2D6</i>	*1	301	0,352	0,310	0,225	Española (2n=210) (Menoyo, del Rio, & Baiget, 2006)
	*2	155	0,081	0,405	0,000*	
	*3	13	0,015	0,009	0,765	
	*4	141	0,165	0,138	0,399	
	*5	22	0,025	0,033	0,711	
	*6	11	0,012	0,009	0,964	
	*9	21	0,025	0,024	1,000	
	*10	19	0,022	0,019	0,985	
	*17	19	0,003	NI	--	
	*35	3	0,064	NI	--	
	*41	55	0,089	NI	--	
	*1XN	23	0,027	NI	--	
	*2XN	14	0,016	NI	--	
	*4XN	0	0,000	NI	--	
	*41XN	1	0,001	NI	--	
<i>CYP3A4</i>	*1	830	0,961	0,957	0,908	Española (2n=326) (Gervasini et al., 2007)
	*1B	34	0,039	0,043		
<i>CYP3A5</i>	*1	71	0,081	0,092	0,642	Española (2n=326) (Gervasini et al., 2007)
	*3	800	0,915	0,908		
	*6	3	0,003	NI		

**Tabla R11.** Frecuencias alélicas en la población control española. Comparación con la población de referencia. NI= No investigado

GEN	ALELO	N	FRECUENCIA	REFERENCIA	P	POBLACIÓN (N)
<b>METABOLISMO DE FASE II</b>						
<b>GSTM1</b>	0	217	0,496	0,505	0,824	Española (2n=2346)
	1	220	0,504	0,495		(Garcia-Closas et al., 2005)
<b>GSTM3</b>	*A	727	0,832	0,850	0,293	Norteamericana (2n=1598)
	*B	147	0,169	0,150		(De Roos et al., 2006)
<b>GSTP1</b>	*A (Ile)	580	0,664	0,714	0,006*	Española (2n=2346)
	*B (Val)	294	0,336	0,286		(Garcia-Closas et al., 2005)
<b>GSTT1</b>	0	85	0,196	0,221	0,305	Española (2n=2346)
	1	349	0,804	0,779		(Garcia-Closas et al., 2005)
<b>NAT2</b>	*4	193	0,222	0,216	0,813	
	*5A	9	0,013	0,015	0,419	
	*5B	368	0,424	0,416	0,859	
	*5C	10	0,011	0,008	0,485	
	*5D	3	0,003	0,003	1,000	
	*5J	1	0,001	NI	--	
	*6A	239	0,275	0,236	0,038*	
	*6B	1	0,001	0,020	0,000*	Española
	*6C	2	0,002	NI	--	(2n=2016)
	*7A	1	0,001	NI	--	(Agundez, Olivera, Martinez,
	*7B	26	0,030	0,012	0,001*	Ladero, & Benitez, 1996)
	*11A	2	0,002	NI	--	
	*12A	2	0,002	0,025	0,061	
	*12B	1	0,001	0,002	0,989	
	*12C	3	0,003	0,010	0,115	
	*13	1	0,001	0,019	0,000*	
	*14A	0	0,000	0,006	0,050*	
	*14B	4	0,005	NI	--	
<b>TPMT</b>	*1	832	0,956	0,947		Británica (2n=398)
	*2	9	0,010	0,005	0,208	(Ameyaw, Collie-Duguid,
	*3A	23	0,026	0,045		Powrie, Ofori-Adjei, &
	*3B	6	0,007	0,003		McLeod, 1999)
<b>UGT1A1</b>	*1	612	0,718	0,678	0,054*	Canadiense (2n=1218)
	*28	240	0,281	0,322		(Guillemette et al., 2001)
<b>TRANSPORTADORES</b>						
<b>MDR1</b>	3435C	464	0,533	0,429	0,007*	CEU HapMap
	3435T	406	0,467	0,571		(2n=226)
<b>SLC6A4</b>	Ins (L)	429	0,504	0,524	0,639	Europea (2n=250)
	Del (S)	423	0,496	0,476		(Zalsman et al., 2006)

**Tabla R11. Frecuencias alélicas en la población control española. Comparación con la población de referencia. NI=No investigado (continuación)**



GEN	ALELO	N	FRECUENCIA	REFERENCIA	P	POBLACIÓN (N)	
RECEPTORES							
ADRB1	389Arg	610	0,703	0,683	0,742	CEU HapMap	
	389Gly	258	0,297	0,317		(2n=120)	
ADRB2	16Arg	677	0,774	0,642	0,059	CEU HapMap	
	16Gly	197	0,291	0,358		(2n=226)	
AGTR1	1166A	627	0,717	0,720	0,958	Italiana (2n=970)	
	1166C	247	0,283	0,280		(Fatini et al., 2009)	
BDKRB2	58C	490	0,560	0,544	0,713	CEU HapMap	
	58T	384	0,439	0,456		(2n=226)	
DRD3	9Ser	578	0,661	0,646	0,723	CEU HapMap	
	9Gly	296	0,338	0,354		(2n=120)	
GRIN2B	2667C	660	0,755	0,788	0,351	CEU HapMap	
	2667T	214	0,245	0,212		(2n=120)	
HTR2A	-102C	478	0,547	0,535	0,813	CEU HapMap	
	-102T	396	0,453	0,465			
	452His	781	0,893	0,938	0,059	(2n=120)	
	452Tyr	93	0,106	0,062			
OTROS							
ADD1	460Gly	735	0,841	0,796	0,135	CEU HapMap	
	460Trp	139	0,159	0,204		(2n=120)	
AGT	235Met	512	0,586	0,588	0,998	CEU HapMap	
	235Thr	362	0,414	0,412		(2n=226)	
BCHE	70Asp	856	0,984	0,996	0,306	CEU HapMap	
	70Gly	14	0,016	0,004			
	539Ala	700	0,803	0,825	0,650		(2n=226)
	539Thr	172	0,197	0,175			
COMT	158Val	475	0,546	0,522	0,571	CEU HapMap	
	158Met	395	0,454	0,478		(2n=226)	
ERCC2	751Gln	574	0,343	0,332	0,808	CEU HapMap	
	751Lys	359	0,657	0,668		(2n=120)	
IL-10	-1082G	359	0,412	0,531	0,002*	CEU HapMap	
	-1082A	513	0,588	0,469		(2n=226)	
MTHFR	677C	546	0,625	0,690	0,080	CEU HapMap	
	677T	328	0,375	0,310		(2n=120)	
TNFα	-308G	784	0,897	0,827	0,005*	CEU HapMap	
	-308A	90	0,103	0,173		(2n=226)	
TYMS	Del 6ps	276	0,316	0,327	0,192	Británica (2n=602)	
	Ins 6pb	596	0,684	0,673		(Hubner et al., 2007)	
VKORC1	-1639A	344	0,393	0,398	0,959	CEU HapMap	
	-1639G	530	0,606	0,602		(2n=226)	

**Tabla R11.** Frecuencias en la población control española. Comparación con la población de referencia. Para los genes *GSTM1* y *GSTT1*, “ausente” se refirió a no tener ninguna copia del gen y “presente” a poseer al menos una copia

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS						
GEN	GENOTIPO	N	FRECUENCIA	REFERENCIA	P	POBLACIÓN (n)
METABOLISMO DE FASE I (CITOCROMO P-450)						
<b>CYP1A1</b>	*1/*1	404	0,924	0,961	0,400	Norteamericana (n=181) (Wenzlaff et al., 2005)
	*1/*2B	32	0,073	0,039		
	*2B/*2B	1	0,002			
<b>CYP1A2</b>	*1/*1	43	0,100	0,100	0,000*	Caucásica (n=495) (Skarke, Kirchhof, Geisslinger, & Lotsch, 2005)
	*1/*1C	1	0,002	0,161		
	*1/*1F	186	0,432	0,417		
	*1C/*1F	8	0,019	NI		
	*1F/*1F	192	0,446	0,483		
<b>CYP2B6</b>	G/G	236	0,540	0,531	0,540	CEU HapMap (n=113)
	G/T	157	0,359	0,398		
	T/T	44	0,101	0,071		
<b>CYP2C19</b>	*1/*1	325	0,747	0,835	0,110	Belga (n=121) (Allabi, Gala, Desager, Heusterspreute, & Horsmans, 2003)
	*1/*2	99	0,227	0,149		
	*1/*4	1	0,002	NI		
	*1/*8	1	0,002	NI		
	*1/*10	0	0,000	NI		
	*2/*2	7	0,016	0,016		
	*2/*4	2	0,004	0,008		
<b>CYP2C8</b>	*1/*1	278	0,636	0,682	0,588	Española (n=355) (Martinez et al., 2005)
	*1/*2	3	0,007	NI		
	*1/*3	107	0,245	0,296		
	*1/*4	29	0,066	NI		
	*2/*3	1	0,002	NI		
	*3/*3	6	0,014	0,023		
	*3/*4	10	0,023	NI		
<b>CYP2C9</b>	*4/*4	3	0,007	NI	0,120	Belga (n=121) (Allabi et al., 2003)
	*1/*1	258	0,590	0,591		
	*1/*2	108	0,247	0,235		
	*1/*3	55	0,126	0,114		
	*2/*2	2	0,004	0,025		
	*2/*3	11	0,025	0,027		
	*3/*3	2	0,005	0,008		
<b>CYP3A4</b>	*3/*6	1	0,002	NI	0,297	Española (n=163) (Gervasini et al., 2007)
	*1/*1	398	0,921	0,822		
	*1/*1B	34	0,079	0,086		
<b>CYP3A5</b>	*1B/*1B	0	0,000	0,066	0,687	Española (n=163) (Gervasini et al., 2007)
	*1/*1	7	0,016	0,012		
	*1/*3	57	0,130	0,159		
	*3/*3	370	0,847	0,828		
	*3/*6	3	0,007	NI		

**Tabla R12.** Frecuencias genotípicas en la población control española. Comparación con la población de referencia. NI= No investigado

GEN	GENOTIPO	N	FRECUENCIA	REFERENCIA	P	POBLACIÓN (n)
METABOLISMO DE FASE II						
GSTM1	Presente	217	0,496	0,505	0,824	Española (n=1173) (Garcia-Closas et al., 2005)
	Ausente	220	0,503	0,495		
GSTM3	*A/*A	297	0,680	0,723	0,182	Norteamericana (n=799) (De Roos et al., 2006)
	*A/*B	133	0,304	0,254		
	*B/*B	7	0,016	0,023		
GSTP1	*A/*A	190	0,435	0,429	0,948	Española (n=1173) (Garcia-Closas et al., 2005)
	*A/*B	200	0,458	0,467		
	*B/*B	47	0,107	0,104		
GSTT1	Presente	85	0,196	0,221	0,305	Española (n=1173) (Garcia-Closas et al., 2005)
	Ausente	349	0,804	0,779		
TPMT	*1/*1	399	0,919	0,904	0,453	Británica (n=199) (Ameyaw et al., 1999)
	*1/*2	8	0,018	0,010		
	*1/*3A	23	0,053	0,080		
	*1/*3C	3	0,007	0,000		
	*3C/*3C	1	0,002	0,000		
UGT1A1	*1/*1	214	0,502	0,454	0,102	Canadiense (n=609) (Guillemette et al., 2001)
	*1/*28	184	0,432	0,447		
	*28/*28	28	0,066	0,099		
TRANSPORTADORES						
MDR1	C/C	115	0,264	0,292	0,501	CEU HapMap (n=113)
	C/T	234	0,558	0,558		
	T/T	86	0,198	0,150		
SLC6A4	L/L	113	0,265	0,303	0,668	Europea (n=125) (Zalsman et al., 2006)
	L/S	203	0,476	0,449		
	S/S	110	0,258	0,248		
RECEPTORES						
ADRB1	Arg/Arg	214	0,493	0,500	0,418	CEU HapMap (n=60)
	Arg/Gly	182	0,419	0,367		
	Gly/Gly	38	0,087	0,133		
ADRB2	Arg/Arg	296	0,677	0,407	0,002*	CEU HapMap (n=113)
	Arg/Gly	86	0,194	0,469		
	Gly/Gly	56	0,128	0,124		
AGTR1	A/A	233	0,533	0,503	0,204	Población italiana (n=485) (Fatini et al., 2009)
	A/C	161	0,368	0,433		
	C/C	43	0,098	0,064		
BDKRB2	C/C	133	0,304	0,292	0,879	CEU HapMap (n=113)
	C/T	224	0,504	0,504		
	T/T	80	0,204	0,204		
DRD3	Ser/Ser	185	0,423	0,442	0,223	CEU HapMap (n=113)
	Ser/Gly	208	0,476	0,407		
	Gly/Gly	44	0,101	0,150		
GRIN2B	C/C	248	0,567	0,628	0,498	CEU HapMap (n=113)
	C/T	164	0,375	0,319		
	T/T	25	0,057	0,053		
HTR2A	C/C	133	0,304	0,274	0,779	CEU HapMap (n=113)
	C/T	213	0,487	0,522		
	T/T	91	0,208	0,204		
	His/His	345	0,789	0,876	0,082	
	His/Tyr	91	0,208	0,124		
	Tyr/Tyr	1	0,002	0,000		

**Tabla R12. Frecuencias genotípicas en la población control española. Comparación con la población de referencia (continuación)**

GEN	GENOTIPO	N	FRECUENCIA	REFERENCIA	P	POBLACIÓN (n)
OTROS						
<b>ADD1</b>	Trp/Trp	11	0,025	0,035	0,266	CEU HapMap (n=113)
	Trp/Gly	117	0,268	0,336		
	Gly/Gly	309	0,707	0,628		
<b>AGT</b>	Thr/Thr	70	0,160	0,195	0,356	CEU HapMap (n=113)
	Thr/Met	222	0,508	0,434		
	Met/Met	145	0,332	0,372		
<b>BCHE</b>	Asp/Asp	421	0,968	0,991	0,327	CEU HapMap (n=113)
	Asp/Gly	14	0,032	0,009		
	Gly/Gly	0	0,000	0,000		
	Ala/Ala	291	0,667	0,667	0,226	CEU HapMap (n=60)
	Ala/Thr	118	0,271	0,317		
	Thr/Thr	27	0,062	0,017		
<b>COMT</b>	Val/Val	131	0,301	0,292	0,670	CEU HapMap (n=113)
	Val/Met	213	0,490	0,460		
	Met/Met	91	0,209	0,248		
<b>ERCC2</b>	Lys/Lys	190	0,435	0,071	0,181	CEU HapMap (n=113)
	Lys/Gln	194	0,444	0,522		
	Gln/Gln	53	0,121	0,071		
<b>IL-10</b>	G/G	69	0,158	0,274	0,004	CEU HapMap (n=113)
	G/A	221	0,507	0,513		
	A/A	146	0,335	0,212		
<b>MTHFR</b>	C/C	169	0,387	0,469	0,182	CEU HapMap (n=113)
	C/T	208	0,476	0,442		
	T/T	60	0,137	0,088		
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	G/G	352	0,805	0,673	0,009	CEU HapMap (n=113)
	G/A	80	0,183	0,310		
	A/A	5	0,011	0,018		
<b>TYMS</b>	Del/Del	44	0,101	0,129	0,393	Británica (n=301) (Hubner et al., 2007)
	Del/Ins	188	0,431	0,395		
	Ins/Ins	204	0,468	0,475		
<b>VKORC1</b>	G/G	62	0,142	0,195	0,147	CEU HapMap (n=113)
	G/A	220	0,503	0,407		
	A/A	155	0,355	0,398		

**Tabla R12.** Frecuencias genotípicas en la población control española. Comparación con la población de referencia

### **3.3. FRECUENCIAS DE METABOLIZADORES LENTOS DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS DEL METABOLISMO EN FASE I Y II**

Para los genes *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *NAT2* y *TPMT* se agruparon los genotipos tal y como se describe en la sección 4.3 de “Material y Métodos”, y se calculó la frecuencia de metabolizadores lentos. Así, para *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2D6*, las frecuencias de metabolizadores lentos fueron 2,1% (n=9), 3,9% (n=17) y 5,1% (n=22), y 59,1% (n=256) para *NAT2* y 0,2% (n=1) para *TPMT*. Además, para *CYP2D6* la frecuencia de metabolizadores ultra rápidos fue el 4,2% de la población (n=18).

#### 4. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE SEGURIDAD DE RISPERIDONA

En el estudio farmacogenético de seguridad de risperidona se evaluó la posible asociación entre las variantes genéticas (*tabla M11*) y la aparición de aquellos efectos adversos derivados del tratamiento con risperidona con una frecuencia  $\geq 10\%$ .

Para ello, se seleccionaron 111 pacientes en tratamiento con risperidona y con registro de la escala UKU, en los cuales se estudiaron 24 efectos adversos frecuentes, 22 de la escala UKU y los efectos adversos extrapiramidales y sexuales (*tabla R3*).

##### 4.1. ASOCIACIÓN DE LOS GENOTIPOS CON LOS EFECTOS ADVERSOS

En este análisis se seleccionaron aquellos efectos adversos con al menos una variante genética asociada ( $p \leq 0,050$ ), que fueron 18 de los 24 de partida (*tabla R13*).

Para aquellas variantes genéticas en las cuales el genotipo asociado al efecto adverso fue el heterocigoto, se evaluó la asociación con los genotipos agrupados según los modelos dominante y recesivo.

Efecto adverso	Genes asociados	Genotipo	p
Somnolencia/sedación	<i>DRD3</i>	Ser/Gly	0,023
Astenia/laxitud/fatigabilidad	<i>ADRA1 563C&gt;T</i>	T/T	0,022
	<i>ADRA1 4155 C&gt;G</i>	G/G	0,017
	<i>SLC6A4</i>	S/S	0,024
Ganancia de peso	<i>SLC6A4</i>	S/S	0,034
Efectos extrapiramidales	<i>DRD3</i>	Gly/Gly	0,050
Dificultad de concentración	<i>DRD3</i>	Ser/Gly	0,039
Estreñimiento	<i>MDR1</i>	C/T	0,047
	<i>SLC6A4</i>	L/S	0,013
		S/S	0,024
Efectos sexuales	<i>SLC6A4</i>	L/S	0,029
	<i>ADRB2</i>	Gly/Arg	0,011
		Arg/Arg	0,041
Mareos/hipotensión ortostática	<i>DRD3</i>	Ser/Gly	0,037
	<i>GRIN2B</i>	Gly/Gly	0,010
		C/T	0,012
		His/Tyr	0,002
Dolor de cabeza	<i>DRD2 Taq1A</i>	A1/A2	0,041
	<i>GRIN2B</i>	C/T	0,041

**Tabla R13.** Estudio de asociación genética con efectos adversos. Variantes genéticas significativamente asociadas a los efectos adversos

Efecto adverso	Genes asociados	Genotipo	p
Tensión /inquietud interna	<i>CYP2D6</i>	IM	0,001
	<i>DRD2 Taq1A</i>	A1/A1	0,050
Disminución de la libido	<i>SLC6A4</i>	S/L	0,008
	<i>ADRB2</i>	Gly/Arg	0,005
		Arg/Arg	0,027
Depresión	<i>GRIN2B</i>	T/T	0,019
Aumento de los sueños	<i>CYP2D6</i>	UM	0,039
	<i>HTR2C</i>	Alelo T	0,011
Dependencia física a fármacos	<i>MDR1</i>	C/T	0,023
	<i>GRIN2B</i>	T/T	0,025
Problemas de acomodación	<i>SLC6A4</i>	S/L	0,049
Dependencia psíquica a	<i>ADRA1 4884G&gt;A</i>	A/A	0,042
fármacos	<i>CYP3A4</i>	*1/*1B	0,015

**Tabla R13 continuación.** Estudio de asociación genética con efectos adversos. Variantes genéticas significativamente asociadas a los efectos adversos

## 4.2. AJUSTE DEL EFECTO POR LAS VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

El sexo, la edad, las dosis de risperidona, el tiempo de ingreso y el consumo concomitante de fármacos fueron evaluados como potenciales factores de confusión del efecto observado. Todas ellas se incluyeron en el análisis como variables categóricas como se describe en la sección 1.1 y 1.2.

En el caso de las dosis de risperidona, a consecuencia de la dificultad de unificar las de las dos formas farmacéuticas administradas, se decidió considerarlas por separado pero incluirlas o excluirlas a la vez del modelo estadístico. Así, en todo momento al hacer el ajuste por la dosis, siempre se consideraron las dos.

El efecto de cada una de las variables sobre la asociación genética se evaluó por separado, de manera secuencial, y se seleccionaron todas aquellas variables que o bien se asociaron significativamente al efecto adverso ( $p \leq 0,050$ ) o modificaron en más de un 20% el efecto del genotipo sobre el efecto adverso (medido como OR). De esta manera se construyó un modelo estadístico con el menor número de variables necesarias para explicar el efecto del genotipo sobre la presencia del efecto adverso.

Los resultados del estudio farmacogenético con los efectos adversos ordenados por orden de frecuencia, el OR (IC95%) y la p de la asociación estadística, junto con las variables por las cuales se ajustó el modelo se detallan en la *tabla R14*.

Efecto adverso	Gen	Genotipo	OR (IC 95%)	p	Covariables
<b>Somnolencia /Sedación</b>	<i>DRD3</i>	Alelo 9Gly	2,47 (1,00-6,09)	0,050	
<b>Astenia/laxitud/ fatigabilidad</b>	<i>ADRA1</i>	-4155 G/G	0,26 (0,10-0,68)	0,006	BDZ
<b>Ganancia de peso</b>	<i>SLC6A4</i>	S/S	0,07 (0,01-0,66)	0,020	AC Ingreso
<b>SEP</b>	<i>DRD3</i>	Alelo 9Gly	0,29 (0,11-0,79)	0,015	AC/D
<b>Dificultad de concentración</b>	<i>DRD3</i>	Ser/Gly	2,46 (1,05-5,79)	0,039	-
<b>Estreñimiento</b>	<i>MDR1</i>	Alelo 3435T	3,19 (1,08-9,42)	0,036	D/Sexo
	<i>SLC6A4</i>	Alelo S	0,21 (0,07-0,60)	0,004	D
<b>Efectos sexuales</b>	<i>SLC6A4</i>	L/S	0,22 (0,06-0,75)	0,015	D
	<i>ADRB2</i>	Alelo 16Gly	4,58 (1,72-12,2)	0,002	AD
<b>Mareos /hipotensión ortostática</b>	<i>DRD3</i>	Alelo 9Gly	7,18 (1,91-27,05)	0,004	AD/Sexo
	<i>GRIN2B</i>	Alelo 2664T	0,17 (0,04-0,75)	0,019	AD/D
	<i>HTR2A</i>	His/Tyr	5,97 (2,03-17,50)	0,001	D
<b>Dolor de cabeza</b>	<i>DRD2</i>	<i>Taq1A</i> A1/A2	0,20 (0,04-0,93)	0,041	-
	<i>GRIN2B</i>	Alelo T	0,14 (0,03-0,70)	0,016	D
<b>Tensión /inquietud interna</b>	<i>CYP2D6</i>	MI	7,08 (2,22-22,58)	0,001	Ninguna
<b>Disminución de la libido</b>	<i>SLC6A4</i>	Alelo S	0,19 (0,06-0,67)	0,009	D
	<i>ADRB2</i>	Alelo 9Gly	6,56 (1,98-21,73)	0,002	BDZ/D
<b>Depresión</b>	<i>GRIN2B</i>	T/T	20,12 (1,01-397,73)	0,049	D/ingreso
<b>Dependencia física a fármacos</b>	<i>MDR1</i>	Alelo T	0,26 (0,09-0,82)	0,021	Sexo
	<i>GRIN2B</i>	T/T	13,42 (1,18-1152,8)	0,036	Ingreso/Sexo
<b>Problemas de acomodación</b>	<i>SLC6A4</i>	Alelo S	0,17 (0,04-0,63)	0,008	Edad

**Tabla R14.** Estudio de asociación genética con efectos adversos. Variantes genéticas significativas (después de ajustar por las variables de confusión). SEP= Efectos extrapiramidales. La denominación “Alelo X” se refiere a el alelo en heterocigosis y homocigosis (modelo dominante). MI=Metabolizador intermedio. BDZ=Benzodiazepinas; AC=Anticolinérgicos; AD=Antidepresivos; D=Dosis de risperidona



La asociación observada para el alelo -563T del gen *ADRA1* y el genotipo S/S de *SLC6A4* con la astenia (*tabla R14*), se perdió al ajustar por las variables “tiempo de ingreso” y “dosis de risperidona”, respectivamente. También se perdió la significación estadística, al ajustar por la edad, en la asociación observada entre el genotipo A1/A1 (*DRD2* Taq1A) y el efecto adverso “tensión/inquietud interna”.

## 5. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE EFICACIA DE RISPERIDONA

En el estudio de eficacia de risperidona se evaluó la asociación entre los genotipos de las variantes genéticas incluidas y la respuesta al tratamiento con risperidona, medida como cambio porcentual durante el ingreso de la escala PANSS (PANSS-N, PANSS-P y PANSS-T). Para ello, se incluyeron 76 pacientes con datos de esta escala.

El estudio se realizó mediante regresión lineal (PANSS-T) y regresión logística (PANSS-N y PANSS-P), en dos pasos al igual que en el estudio de seguridad.

### 5.1. ESTUDIO DE EFICACIA MEDIDA COMO CAMBIO EN LA ESCALA PANSS TOTAL

En el caso de la escala PANSS-T, el fenotipo lento del *CYP2D6* y los genotipos Arg/Gly de *ADRB1* ( $p=0,050$ ) y CT y TT de *MDR1* ( $p=0,024$  y  $p=0,010$  respectivamente) resultaron significativamente asociados al cambio.

Para *ADRB1* y *MDR1* se evaluaron también los modelos dominante y recesivo y el resultado fue que la asociación de *MDR1* según el modelo dominante fue significativa ( $p=0,007$ ) y en el caso de *ADRB1*, se perdió la significación en ambos modelos, por lo que se continuó el análisis con el modelo codominante.

Los resultados, tras ajustar por las variables demográficas y clínicas, se resumen en la *tabla R15*, en la que se muestra la diferencia de cambio (de media) en la escala PANSS-T respecto del genotipo silvestre (o metabolizador normal en el caso de *CYP2D6*) y el valor  $p$  de la asociación ajustado por las variables demográficas y clínicas.

Gen	Diferencia de medias (%)	IC 95%	p	Covariables
<b><i>CYP2D6</i> MI</b>	0,2%	-8,5-8,87	0,968	
<b><i>CYP2D6</i> ML</b>	34,4%	13,6-55,3	0,002*	APC
<b><i>CYP2D6</i> MU</b>	19,9%	-37,6-32,6	0,886	
<b><i>MDR1</i> CT+TT</b>	14,9%	5,0-24,8	0,004*	APA

**Tabla R15.** Cambio porcentual en la escala PANSS-T tras el tratamiento: Variantes genéticas asociadas. MI: Metabolizador intermedio; ML: Metabolizador lento; MU: Metabolizador ultrarrápido APC: Antipsicóticos clásicos; APA: Antipsicóticos atípicos. \*Asociación significativa con el cambio

La asociación significativa encontrada con el gen *ADRB1*, se perdió al ajustar por el tiempo de ingreso.

Como se desprende de la *tabla R15*, los pacientes metabolizadores lentos de *CYP2D6* tuvieron una puntuación significativamente mejor en la escala PANSS-T con una media de cambio de 34,4% más que los metabolizadores normales. Además, los portadores del alelo T de la variante 3435 C>T de *MDR1*, en heterocigosis y homocigosis, tuvieron, de media un 14,9% más cambio que los homocigotos silvestres.

## **5.2. ESTUDIO DE EFICACIA MEDIDA COMO CAMBIO EN LA ESCALA PANSS NEGATIVA**

Para la escala PANSS-N se encontró, de nuevo, significativamente asociado el fenotipo metabolizador lento de *CYP2D6* ( $p=0,034$ ). Tras ajustar por las variables de confusión, este fenotipo resultó ser protector frente a ser 'no respondedor' con un  $OR=0,02$  ( $0,00-0,47$ ;  $p=0,013$ ).

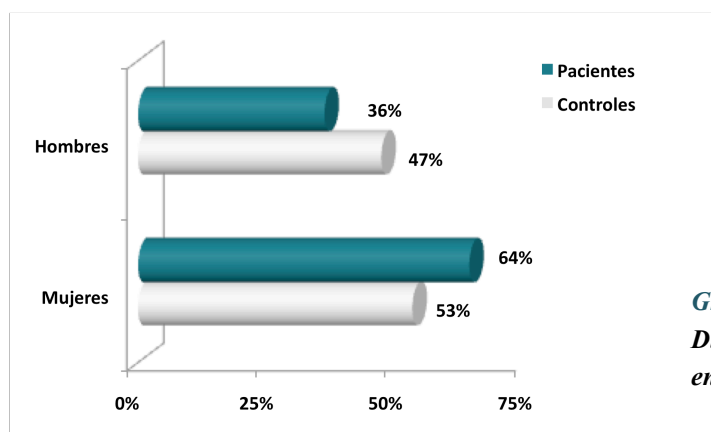
## **5.3. ESTUDIO DE EFICACIA MEDIDA COMO CAMBIO EN LA ESCALA PANSS POSITIVA**

El genotipo Arg/Gly de *ADRB1* se encontró significativamente asociado a ser 'no respondedor' en la escala PANSS-P ( $p=0,050$ ). El análisis con los modelos dominante y recesivo no resultó significativo.

Finalmente, al ajustar el efecto por las variables de confusión se perdió la significación estadística.

## 6. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON LA ESQUIZOFRENIA

Con todos los pacientes y los controles, 232 y 437, respectivamente, se realizó un estudio de asociación caso-control con la esquizofrenia. Para ello, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas (o fenotípicas, para *CYP2D6*) de las variantes genéticas seleccionadas entre casos y controles, primero de manera global y estratificando por el sexo con el test  $\chi^2$ . La distribución de sexos en casos y controles se encuentra representada en el *gráfico R3*.



**Gráfico R3.**  
*Distribución de sexos  
entre casos y controles*

La única variante genética significativamente asociada fue -1082G>A en *IL-10*. Por esto, se consideró ampliar el estudio genético y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los haplotipos del promotor de *IL-10* entre casos y controles, estratificando y sin estratificar la población por el sexo.

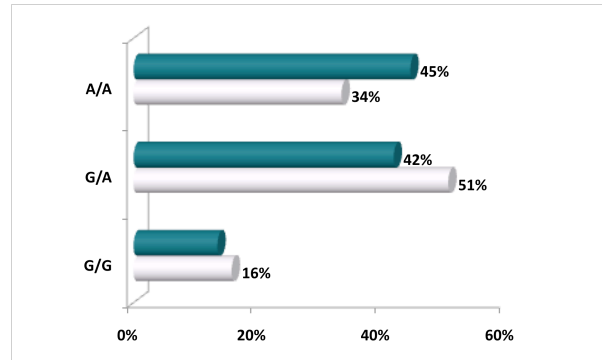
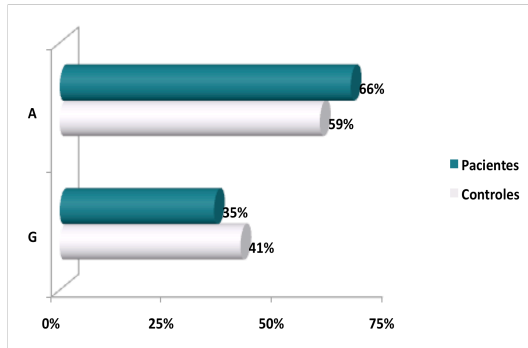
### 6.1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON LAS VARIANTES GENÉTICAS SELECCIONADAS DE *PHARMAChip*®

#### 6.1.1. Análisis global

En un primer paso se realizó un estudio de asociación sin tener en cuenta la variable sexo, para evaluar la posible asociación de las variantes genéticas con la esquizofrenia *tabla M14* (sección 4.5.2. de “Material y Métodos”).

En éste se encontró significativamente asociado a la esquizofrenia el alelo -1082A de *IL-10*, con un OR (IC95%)=1,30 (1,02-1,66) (p=0,027). Lo mismo ocurrió al comparar

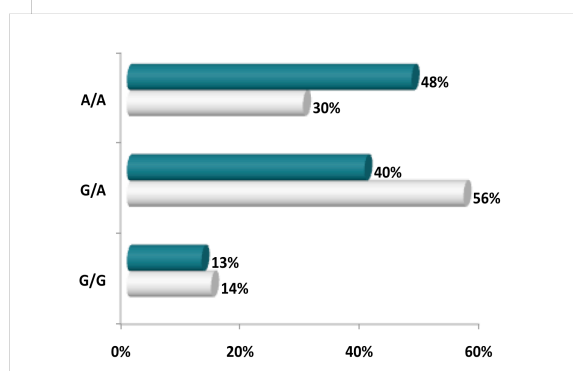
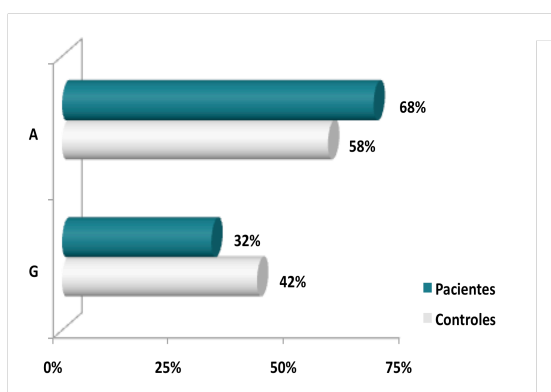
las frecuencias genotípicas entre casos y controles, con una mayor incidencia de genotipo A/A en esquizofrénicos (44,6% frente a 33,5% en controles) y menor incidencia de G/A (41,9% frente a 50,7%) ( $p=0,020$ ) (gráficos R4 y R5).



**Gráficos R4 y R5.** Frecuencias alélicas (R4, izquierda) y genotípicas (R5, derecha) de la variante - 1082G>A entre casos y controles.

### 6.1.2. Análisis estratificado por sexo

En este segundo análisis se compararon las frecuencias alélicas, genotípicas y fenotípicas (*CYP2D6*) entre casos y controles estratificando la población por el sexo. De nuevo, la única variante genética asociada significativamente a la esquizofrenia fue - 1082G>A del gen *IL-10*, pero exclusivamente en la población de mujeres, en las que se encontró una incidencia significativamente mayor del alelo A en pacientes (67,7% frente a 57,7% en controles con un OR=1,57 (1,04-2,25;  $p=0,027$ ) y el genotipo A/A (47,7% en pacientes frente a 29,5% en controles;  $p=0,008$ ) (gráficos R6 y R7).



**Gráficos R6 y R7.** Frecuencias alélicas (R6, izquierda) y genotípicas (R7, derecha) de la variante - 1082G>A entre casos y controles en las mujeres.

## 6.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL CON LOS HAPLOTIPOS DEL PROMOTOR DEL GEN *IL-10*

En un segundo estudio, se determinaron los haplotipos que forma la variante -1082G>A, junto con otras dos en las posiciones -819 (C>T) y -592 (C>A) en el promotor del gen.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la variantes -592C>A y 819C>T y de los haplotipos se compararon entre casos y controles, primero sin estratificar y posteriormente estratificando por el sexo.

### 6.2.1. Determinación de los haplotipos del promotor del gen *IL-10*.

El tamaño muestral de los pacientes y los controles incluidos en este estudio fue de 241 y 381, respectivamente. Esta diferencia se debió a la inclusión en el caso de los pacientes de 9 muestras más (de las que no se mandaron a *PHARMAChip®* por no cumplir las especificaciones de calidad requeridas por *Progenika*) y en el caso de los controles a no recuperar la totalidad de las muestras control incluidas en la primera parte del estudio de asociación (n=437).

El haplotipo del promotor se dedujo a partir de las dos variantes genéticas determinadas, -1082G>A por *Progenika* y -592C>A mediante discriminación alélica. Los resultados de genotipo de las dos variantes se comprobaron secuenciando 100 muestras seleccionadas de manera aleatoria, con lo que se encontró una concordancia del 98% en ambos casos.

Además, se verificó que las distribuciones de los genotipos de las variantes y de los haplotipos cumplían el EHW en los casos y en los controles.

### 6.2.2. Análisis global

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante -592C>A, -819C>T y de los haplotipos se compararon entre los casos y los controles mediante el test  $\chi^2$  (tabla R16) y de nuevo exclusivamente la variante -1082G>A resultó significativa.

SNPS	CONTROLES (N=381)	PACIENTES (N=241)	$\chi^2$ p
	n (%)	n (%)	
-1082G	359 (41,2%)	158 (34,5%)	0,027*
-1082A	513 (58,8%)	300 (65,5%)	
GG	69 (15,8%)	31 (13,5%)	0,020*
GA	221 (50,7%)	96 (41,9%)	
AA	146 (33,5%)	102 (44,6%)	
-819C	576 (77,0%)	352 (73%)	0,130
-819T	172 (23,0%)	130 (27,0%)	
CC	219 (58,6%)	133 (55,2%)	0,078
CT	138 (36,9%)	86 (35,7%)	
TT	17 (4,5%)	22 (9,1%)	
-596C	572 (75,1%)	353 (72,0%)	0,261
-596A	190 (24,9%)	137 (28%)	
CC	216 (56,7%)	131 (53,5%)	0,398
CA	140 (36,7%)	91 (37,1%)	
AA	25 (6,6%)	23 (9,4%)	
<b>HAPLOTIPOS</b>			
GCC	312 (41,0%)	169 (35,1%)	0,100
ACC	263 (34,6%)	181 (37,5%)	
ATA	185 (24,4%)	132 (27,4%)	
GCC/GCC	59 (15,5%)	35 (14,5%)	0,127
GCC/ACC	108 (28,4%)	59 (24,5%)	
GCC/ATA	86 (22,7%)	40 (16,6%)	
ACC/ACC	51 (13,5%)	38 (15,8%)	
ACC/ATA	53 (13,9%)	46 (19,1%)	
ATA/ATA	23 (6,0%)	23 (9,5%)	

**Tabla R16.** Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles de los polimorfismos del promotor de IL-10 y los haplotipos que forman. \*Diferencias significativas

### 6.2.3. Análisis estratificado por sexo

En la *tabla R17* se muestra la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles en las poblaciones de mujeres y hombres. Como puede observarse, en el caso de los hombres, ni las variantes ni los haplotipos se encontraron significativamente asociados a los pacientes esquizofrénicos. En cambio en el caso de las mujeres, la distribución alélica de la variante -1082G>A, y genotípica de todas las variantes y de los genotipos que forman los haplotipos del promotor fue significativamente diferente entre pacientes y controles. Así, los genotipos A/A (-

1082G>A), T/T (-819C>T), A/A (-596C>A) y ATA/ATA tuvieron una incidencia significativamente mayor en mujeres esquizofrénica que en controles.

	HOMBRES N (%)			MUJERES N (%)		
	Controles	Pacientes	χ2	Controles	Pacientes	χ2
	(N=181*)	(N=153)	(P)	(N=200*)	(N=88)	(P)
SNPS						
-1082G	164 (40,8%)	111 (36,3%)	0,252	198 (42,3%)	57 (32,4%)	0,027**
-1082A	238 (59,2%)	195 (63,7%)		270 (57,7%)	119 (67,6%)	
GG	38 (18,9%)	23 (15%)	0,502	33 (14,1%)	11 (12,5%)	0,008**
GA	88 (43,8%)	65 (42,5%)		132 (56,4%)	35 (39,8%)	
AA	75 (37,3%)	65 (42,5%)		69 (29,5%)	42 (47,7%)	
-819C	273 (77,6%)	227 (74,2%)	0,358	303(76,5%)	125 (71%)	0,196
-819T	79 (22,4%)	79 (25,8%)		93 (23,5%)	51 (29%)	
CC	110 (62,5%)	84 (54,9%)	0,272	109 (55,1%)	49 (55,7%)	0,000**
CT	53 (30,1%)	59 (38,6%)		85 (42,9%)	27 (30,7%)	
TT	13 (7,4%)	10 (6,5%)		4 (2%)	12 (13,6%)	
-592C	274 (75,7%)	230 (73,7%)	0,618	298 (74,5%)	123 (69,1%)	0,212
-592A	88 (24,3%)	82 (26,3%)		102 (25,5%)	55 (30,9%)	
CC	110 (60,8%)	84 (53,9%)	0,134	106 (53,5%)	47 (52,8%)	0,004**
CA	54 (29,8%)	62 (39,7%)		86 (43,4%)	29 (32,6%)	
AA	17 (9,4%)	10 (6,4%)		8 (4,1%)	13 (14,6%)	
HAPLOTIPOS						
GCC	146 (40,3%)	111 (36,3%)	0,557	167 (41,8%)	58 (33,0%)	0,124
ACC	126 (34,8%)	115 (37,6%)		134 (33,5%)	65 (36,9%)	
ATA	90 (24,9%)	80 (26,1%)		99 (24,8%)	53 (30,1%)	
GCC/GCC	33 (18,2%)	23 (15,0%)	0,382	26 (13,0%)	12 (13,6%)	0,003**
GCC/ACC	48 (26,5%)	39 (25,5%)		60 (30,0%)	20 (22,7%)	
GCC/ATA	32 (17,7%)	26 (17,0%)		55 (27,5%)	14 (15,9%)	
ACC/ACC	28 (15,5%)	22 (14,4%)		22 (11,0%)	16 (18,2%)	
ACC/ATA	22 (12,2%)	32 (20,9%)		30 (15,0%)	13 (14,8%)	
ATA/ATA	18 (9,9%)	11 (7,2%)		7 (3,5%)	13 (14,8%)	

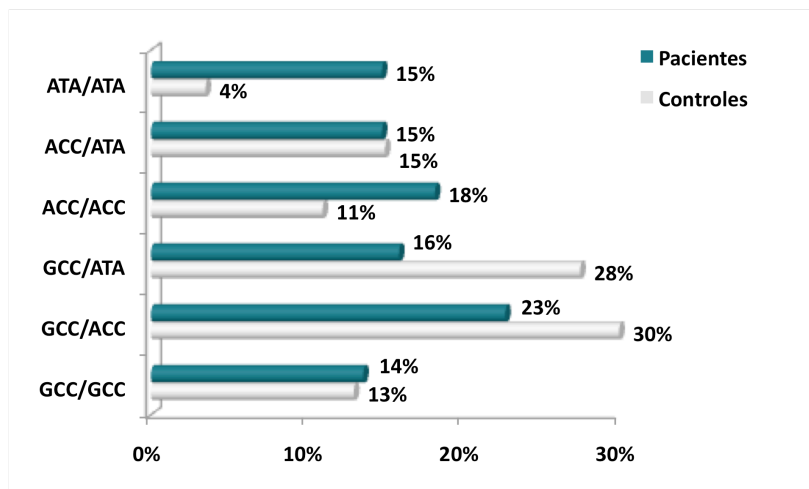
**Tabla R17.** Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del promotor de IL-10 y los haplotipos que forman entre casos y controles estratificados por sexo. \*Tamaños muestrales del estudio de haplotipos. Los n para la variante -1082G>A son 201 hombres y 234 mujeres. \*\*Diferencias significativas.



El test de igualdad de proporciones se utilizó para comparar las frecuencias de cada genotipo entre las mujeres esquizofrénicas y las mujeres control. El resultado fue que el genotipo ATA/ATA se encontraba significativamente más representado en las pacientes y el GCC/ATA en controles (*tabla R18 y gráfico R8*).

Genotipo	Controles (n=200) N (%)	Pacientes (n=88) N (%)	Igualdad de proporciones P
GCC/GCC	26 (13,0%)	12 (13,6%)	1,000
GCC/ACC	60 (30,0%)	20 (22,7%)	0,260
GCC/ATA	55 (27,5%)	14 (15,9%)	0,048*
ACC/ACC	22 (11,0%)	16 (18,2%)	0,142
ACC/ATA	30 (15,0%)	13 (14,8%)	1,000
ATA/ATA	7 (3,5%)	13 (14,8%)	0,001*

**Tabla R18.** Comparación de proporciones de los distintos genotipos en las mujeres sanas y esquizofrénicas. \*Diferencias significativas



**Gráfico R8.**  
Frecuencias genotípicas de los haplotipos del promotor de IL-10 entre casos y controles en mujeres

A raíz de estos resultados, se evaluó el papel del alelo ATA como factor de susceptibilidad a la esquizofrenia, de manera que se agruparon los genotipos según el número de alelos ATA (2, 1 ó 0) y las frecuencias resultantes se compararon de nuevo entre casos y controles en el grupo de mujeres (*tabla R19*).

	Controles (n=200) n (%)	Pacientes (N=88) n (%)	Igualdad de proporciones (p)
<b>2ATA</b>	7 (3,5%)	13 (14,8%)	0,001*
<b>1 ATA</b>	85 (42,5%)	27 (30,7%)	0,078
<b>0 ATA</b>	108 (54,0%)	48 (54,5%)	1

**Tabla R19.** Comparación de proporciones entre las mujeres portadoras de 2, 1 o ningún alelo ATA entre casos y controles. \*Diferencias significativas

La comparación demostró de nuevo la asociación estadísticamente significativa entre el alelo ATA en homocigosis y la esquizofrenia, mientras que no se encontraron diferencias en la distribución de los heterocigotos ATA o los no portadores entre casos y controles, con los genotipos agrupados de esta manera.

A continuación se evaluó el riesgo, medido como OR (IC95%), que proporcionó la homocigosis de ATA frente a la heterocigosis y a ser no portador de ATA, en el desarrollo de esquizofrenia (tabla R20).

	OR	95%CI	$\chi^2$ (p)
<b>2 ATA vs. 1ATA</b>	5,85	1,91-18,90	0,000*
<b>2 ATA vs. 0ATA</b>	4,18	1,43-13,08	0,002*
<b>1 ATA vs. 0ATA</b>	0,71	0,39-1,28	0,231

**Tabla R20.** OR proporcionado por el alelo ATA en homocigosis y heterocigosis para el desarrollo de esquizofrenia. \*Diferencias significativas

Los resultados evidencian nuevamente la homocigosidad de ATA como factor de riesgo para esquizofrenia teniendo los homocigotos 5,85 veces más riesgo que los heterocigotos y 4,18 veces que los no portadores de ATA de desarrollar esquizofrenia.



## *Discusión*

## 1. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE *PHARMAChip®*

Gracias al mejor conocimiento del genoma humano, las técnicas de genotipado y secuenciación han experimentado una revolución en los últimos años, con herramientas que permiten la caracterización de cientos de miles de SNPs y la secuenciación de todo el genoma en un tiempo y con unos costes cada vez menores (Bhasker & Hardiman, 2010). Una de las consecuencias de esto es que cada vez existen más herramientas destinadas al diagnóstico farmacogenético (Fleeman et al., 2010). No obstante, para que una herramienta farmacogenética se implante en la práctica clínica, debe demostrarse su utilidad analítica y clínica, además de ser coste-efectiva (Fleeman et al., 2010).

Recientemente se ha comercializado en España *PHARMAChip®*, un chip de genotipado en farmacogenética, que incluye 90 variantes en genes implicados en la farmacocinética y farmacodinamia de una gran variedad de fármacos (*tabla MI*). Entre las variantes incluidas se encuentran algunos de los marcadores farmacogenéticos recomendados por la FDA, como *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *NAT2*, *TPMT*, *UGT1A1*, *DPYD* y *VKORC1* (Table of valid genomic biomarkers in the context of approved drug labels, FDA), mientras que para el resto de las variantes aún no ha sido demostrada su utilidad clínica.

En línea con lo anterior, en este trabajo, se evaluó la utilidad de *PHARMAChip®* como alternativa al genotipado farmacogenético convencional (métodos basados en la PCR) mediante la determinación de características analíticas como la tasa de genotipado, sensibilidad y especificidad, precisión, manipulación y tiempo de espera de los resultados, para su posible implantación en la práctica clínica.

La tasa de genotipado obtenida fue muy alta, con más del 99% de los genotipos obtenidos con éxito, así como la tasa de muestras genotipadas, un 98,2%. La no obtención de resultados en el 1,8% de las muestras pudo deberse al método de extracción no automatizado del ADN y por lo tanto, a una posible presencia de contaminantes que pudieran interferir con el proceso de genotipado, ya que esta fue la variable común a todas ellas.

En el resto de las muestras, en los casos en los que no se obtuvo el resultado en alguna variante, esto fue debido a la falta de hibridación de la muestra para esa sonda

específica, resultado que el *software* proporcionó como *no call*, o a la presencia de alelos no incluidos en *PHARMAChip®* (*undetermined*) como consecuencia de la combinación de SNPs no reconocida por el *software*.

Los fallos de genotipado *no call* fueron especialmente frecuentes (a pesar de suponer un pequeño porcentaje de las muestras analizadas) en los VNTRs de los promotores de *UGT1A1* y *SLC6A4*. Esto sugiere que para este tipo de variantes quizás las condiciones de genotipado deban ser más restrictivas que para el resto, que son polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).

Además, a pesar de que se ha establecido para *PHARMAChip®* el límite de detección en 75 ng de ADN, se ha descrito que cantidades menores de 100 ng pueden comprometer el genotipado con un aumento en la tasa de errores y fallos de genotipado (Cuyas et al., 2010). Esto puede ser otra de las razones de no obtenerse los genotipos de la totalidad de variantes incluidas en el chip.

Por otro lado, se observaron resultados *undetermined* en *CYP1A2*, *CYP2D6* y *NAT2* implicados en el metabolismo de fármacos fase I o II y altamente polimórficos, por lo que aunque *PHARMAChip®* es capaz de discriminar un gran número de alelos (*tabla MI*), se han descrito más de 40 en *CYP1A2*, más de 80 en *CYP2D6* (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee, acceso enero 2011) y más de 60 en *NAT2* (Consensus Human Arylamine N-Acetyltransferase Gene Nomenclature/ acceso enero 2011). En consecuencia, la tasa de genotipado obtenida para estos genes fue muy alta teniendo en cuenta la gran variabilidad alélica existente.

La sensibilidad y especificidad se determinaron comparando los resultados obtenidos mediante métodos basados en la PCR para 9 alelos de *CYP2D6* frecuentes en caucásicos y el VNTR del promotor de *SLC6A4*. Se eligieron estos dos genes por haber sido previamente genotipados, mediante los métodos mencionados, para otros estudios, ya que *CYP2D6* es uno de factores farmacocinéticos más importantes, por la variabilidad interindividual en relación a la capacidad metabólica, y *SLC6A4* uno de los genes más estudiados en relación con la etiología de la esquizofrenia y la respuesta a fármacos antipsicóticos (Allen et al., 2008) (Zhou et al., 2008).

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron cercanos al 99% en la mayoría de los casos. La excepción fue la sensibilidad obtenida para *CYP2D6\*5* del

83,3%, que puede explicarse por el bajo número de individuos portadores de este alelo y la incapacidad de *PHARMAChip*® en la detección de uno de ellos, que fue considerado como alelo \*1.

De manera global, los resultados obtenidos hacen de *PHARMAChip*® una herramienta adecuada para el genotipado farmacogenético, desde el punto de vista analítico.

Desde el punto de vista clínico, *PHARMAChip*® podría resultar especialmente útil en el genotipado de las enzimas metabolizadoras de fármacos de fase I (citocromo P-450) y II, ya que la mayoría de los fármacos comercializados hoy en día son sustrato de las mismas y muchos de ellos experimentan los dos tipos de metabolismo (Zhou et al., 2008). Además, los genes que las codifican son, por lo general, muy polimórficos (Zhou et al., 2008) y *PHARMAChip*® incluye la mayoría de alelos presentes en caucásicos, lo que permite una discriminación fenotípica muy precisa.

No obstante, la principal limitación de *PHARMAChip*® es su diseño ya que incluye variantes genéticas de naturaleza muy diversa, relacionadas con la respuesta terapéutica a una miscelánea de fármacos. Estas variantes, salvo las implicadas en farmacocinética, no tienen en la mayoría de los casos relación entre sí, por no pertenecer ni a vías metabólicas comunes a un fármaco o grupo terapéutico, ni a mecanismos de acción específicos. Por lo tanto, la información farmacogenética proporcionada por *PHARMAChip*® resulta excesiva e innecesaria, ya que la utilidad en muchas de las variantes genéticas incluidas aún no ha sido demostrada. Todo esto tiene como consecuencia que el genotipado con esta herramienta se encarezca respecto de otros métodos, ya que en la actualidad cuando se necesita información farmacogenética, esta suele implicar uno o como mucho dos de las variantes genéticas incluidas en *PHARMAChip*® cuyo precio es proporcional a 36.

## **2. FRECUENCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS Y DE METABOLIZADORES LENTOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA**

Existe evidencia de que la mayoría de las variantes implicadas en farmacogenética muestran una gran variabilidad inter-étnica e incluso intra-étnica en muchos de los casos (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Esto hace especialmente importante el establecimiento de las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes farmacogenéticas en cada población a la hora de investigar su papel en la respuesta terapéutica.

Apoyado en este razonamiento, y debido a que la distribución de muchas de las variantes incluidas en *PHARMACHip*® no se encuentra descrita en población española, se genotipó con esta herramienta una población control española y se compararon los resultados obtenidos con los publicados en población caucásica. La población seleccionada como referencia fue la población CEU del Proyecto Internacional HapMap constituida por residentes de Utah con origen ancestral del Norte y Oeste de Europa. Se utilizó esta población en lugar de la de Toscanos en Italia (TSI), recientemente incluida, por estar caracterizados en esta última un menor número de SNPs (HapMap acceso abril 2010).

Aunque el reclutamiento de la población control estudiada se realizó en dos centros de distinta localización, Madrid y Badajoz, al haber sido descrito que no existe una estratificación significativa de población española (Flores et al., 2004) se asumió que los controles eran representativos de esta población.

### **2.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS INCLUIDAS EN *PHARMACHIP*®**

Los resultados obtenidos mostraron por lo general homogeneidad en la distribución de la mayoría de las variantes al compararlas con las poblaciones caucásicas seleccionadas. Excepciones a esto fueron las frecuencias alélicas encontradas en los genes *CYP2D6*, *NAT2*, *UGT1A1*, *GSTP1* y *MDR1*, las frecuencias genotípicas en *CYP1A2* y *ADRB2* y la distribución de los alelos y los genotipos de *IL-10* y *TNF $\alpha$* .



Las diferencias encontradas en *CYP2D6*\*2 pudieron deberse a que en la población tomada como referencia, el alelo \*2 estaría sobre representado (Menoyo et al., 2006). En el estudio de Menoyo y colaboradores no se determinan los alelos \*35 y \*41, ambos haplotipos formados por la combinación del alelo \*2 con las variantes V11M y 2988G>A, respectivamente (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee, acceso abril 2010). Por lo tanto, el discriminar en la población estudiada estos dos alelos conlleva frecuencias para el alelo \*2 menores.

En el caso de los alelos de *NAT2*, las diferencias encontradas podrían explicarse por la utilización de criterios diferentes de asignación de los alelos o el uso de métodos menos sensibles que en la actualidad, ya que el estudio se realizó hace más de 10 años (Agundez et al., 1996). No obstante, se ha descrito que existen diferencias intra-étnicas para este gen (Garcia-Martin, 2008).

En el resto de las diferencias intra-étnicas observadas, éstas han sido previamente descritas en el caso del alelo \*28 de *UGT1A1* en población china (Zhang et al., 2007) o en *GSTP1* en población hindú (Mishra, Kumar, Srivastava, & Mittal, 2004) y en las variantes 3435C>T de *MDR1*, -1082G>A de *IL-10* y -308G>A de *TNF $\alpha$*  en población caucásica (HapMap acceso abril 2010). En estas últimas, las diferencias encontradas con la población CEU del HapMap, no se observan al compararlas con la población de Toscanos (TSI del HapMap), probablemente debido a la mayor proximidad geográfica de esta última población.

Para *CYP1A2* las diferencias en las frecuencias genotípicas pueden explicarse por discriminar el estudio de referencia un mayor número de alelos y por lo tanto ser capaz de estratificar de forma más precisa a la población (Skarke et al., 2005).

En el caso de *ADRB2* las diferencias encontradas pueden explicarse por no cumplir la variante Arg16Gly el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población estudiada.

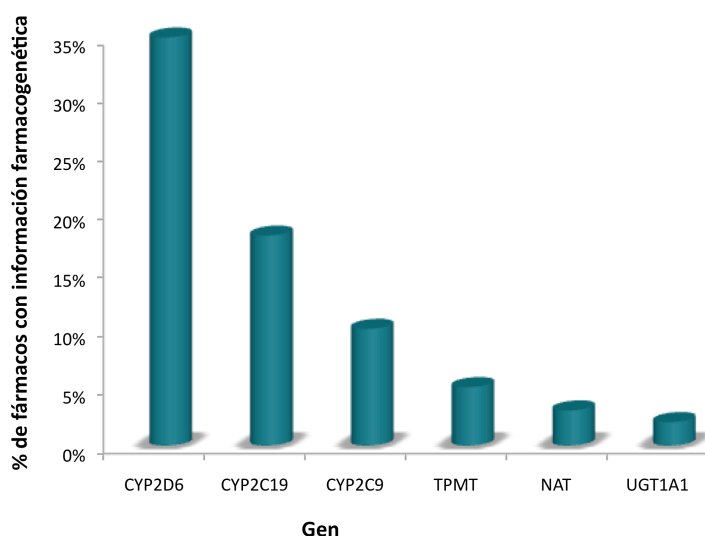
Además, la variante IVS14+1G>A del gen *DPYD* no resultó polimórfica en los controles, casi con seguridad debido al bajo tamaño muestral utilizado, ya que esta variante se encuentra en la población CEU del HapMap en una frecuencia de 0,004 (HapMap acceso, acceso abril 2010) con lo que la probabilidad de encontrarla en la población estudiada era muy baja.

En conclusión, estas diferencias intra-étnicas encontradas apoyan la necesidad de establecer las frecuencias alélicas y genotípicas reales en cada población caucásica, incluida la española, para realizar una selección de poblaciones control adecuada para los estudios farmacogenéticos y evitar sesgos de estratificación.

## 2.2. FRECUENCIAS DE METABOLIZADORES LENTOS PARA LAS PRINCIPALES ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS DE FASE I Y II.

El principal factor implicado en la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos es la variación en la farmacocinética, principalmente debido a diferencias en la actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de fármacos, genéticamente determinadas (Ingelman-Sundberg & Sim, 2010).

La FDA ha recomendado para el manejo terapéutico de ciertos fármacos la determinación de marcadores farmacogenéticos entre los que se encuentran *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2D6*, implicados en el metabolismo de fase I y *NAT2*, *TPMT* y *UGT1A1* (Table of valid genomic biomarkers in the context of approved drug labels, FDA ), en el de fase II. Estos genes representan más del 70% de toda la información farmacogenética que este organismo ha incluido en más de 121 fármacos (Frueh et al., 2008) (figura D1).



**Figura D1.**  
*Porcentaje de fármacos comercializados que incluye información farmacogenética en relación con los genes implicados en el metabolismo de fase I y II estudiados en este trabajo. Modificado de Frueh et al., 2008*

Las frecuencias de metabolizadores lentos para las tres enzimas de fase I y de ultrarrápidos de CYP2D6 fueron similares a las reportadas en caucásicos (Llerena, Dorado, Penas-Lledo, Caceres, & De la Rubia, 2007) (Mizutani, 2003). Estas enzimas pertenecen a la superfamilia del citocromo P-450, encargada de la oxidación de más del 60% de los fármacos comercializados en la actualidad (Zhou et al., 2008). Los genes que las codifican son muy polimórficos (Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee) lo que resulta en la población dividida en metabolizadores ultra rápidos, normales, intermedios y lentos (Gervasini et al., 2010) en función del número de alelos funcionales que porten los individuos (más de dos, dos, uno o ninguno, respectivamente (Ingelman-Sundberg & Sim, 2010) (*tabla D1*).

Fenotipo	Genética	Consecuencias
Ultra rápido	Más de 2 copias del gen o aumento de su expresión (solo <i>CYP2C19</i> y <i>CYP2D6</i> )	Falta de respuesta Aumento de RAM por aumento de metabolitos en sangre o de fármaco activo
Normal	Dos alelos funcionales	Respuesta normal
Intermedio	Un alelo defectivo	Aumento de la concentración del fármaco Disminución de la transformación en metabolito activo
Lento	Dos alelos defectivos	Altos niveles de fármaco en sangre Alto riesgo de RAM

**Tabla D1. Fenotipos posibles en CYP2C19, CYP2C9 y CYP2D6, variaciones genéticas responsables y consecuencias clínicas del fenotipo. RAM: Reacciones adversas a medicamentos. Modificado de Ingelman-Sundberg & Sim, 2010**

Las enzimas que codifican estos genes, CYP2C19, CYP2C9 y CYP2D6, se encargan de aproximadamente el 40% del metabolismo de los fármacos comercializados en la actualidad (Ingelman-Sundberg & Sim, 2010) entre los que se incluyen muchos de los más prescritos como los inhibidores de la bomba de protones, antidepresivos, benzodiazepinas, antiinflamatorios no esteroideos, diuréticos, beta-bloqueantes o antipsicóticos. El metabolismo lento de estas enzimas se ha asociado a ineficacia o aparición de efectos adversos a una variedad de fármacos (*tabla D1*) (Ingelman-Sundberg & Sim, 2010).

Por otro lado, aparte de los miembros del citocromo P-450, también resultan de interés en farmacogenética *NAT-2*, *TPMT* y *UGT1A1*, implicados en el metabolismo de fase II

de los fármacos y polimórficos, lo que resulta en enzimas con distintas capacidades metabólicas (Zhou et al., 2008) (Sheffield & Phillimore, 2009). Las frecuencias de metabolizadores lentos para las enzimas de fase II en la población control española no difirieron de las reportadas en caucásicos (Garcia-Closas et al., 2005) (Corominas et al., 2006) (Guillemette et al., 2001). El establecimiento de estas frecuencias es importante ya que metabolismo acetilador lento de NAT-2 se ha asociado a toxicidad inducida por isoniazida (Meyer, 2004) y en el caso de TPMT y UGT1A1 a una diferente respuesta de sus sustratos, azatioprina o 5-fluorouracilo entre otros (Paez et al., 2010) (Ando et al., 2000) (*tabla D2*).

Gen	Fármaco	Efecto
CYP2C19 ML	Clopidogrel	Eficacia disminuida: alta incidencia de eventos cardiovasculares
	Voriconazol/Omeprazol	Mayor exposición
CYP2C9 ML	Celecoxib	Niveles plasmáticos anormalmente altos
	Warfarina	Mayor riesgo de sangrado y dosis menores recomendadas
CYP2D6 ML/MU	Tamoxifeno	ML: Menor concentración de metabolito activo
	Amitriptilina	ML: Mayor incidencia de efectos adversos MU: Falta de efectividad
	Codeína	ML: No efectividad MU: Mayor sedación y toxicidad opioide
NAT-2	Rifampicina/Isoniazida	Mayor concentración en sangre y toxicidad
TPMT ML	Tiopurinas	Alto riesgo de mielosupresión y neutropenia
UGT1A1 *28/*28	Irinotecán	Mayor toxicidad, diarrea, neutropenia

**Tabla D2. Fármacos para los cuales existe un biomarcador recomendado por la FDA. ML: Metabolizador lento; MU: Metabolizador ultrarrápido. Adaptado de Sheffield & Phillimore, 2009 y FDA**

No obstante, a pesar de la creciente evidencia de la implicación de la variación de estos genes en la diferente respuesta terapéutica entre individuos, la utilidad clínica del genotipado sistemático de estos marcadores, en la práctica clínica, aún está por demostrar para la mayoría de los fármacos (Frueh et al., 2008). Así, es necesario el establecimiento de las frecuencias de metabolizadores lentos o ultrarrápidos a la hora de determinar el impacto que tendrá, una vez demostrada su utilidad, la implantación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual.

### 3. UTILIDAD DE LA FARMACOGENÉTICA EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA A RISPERIDONA

El objetivo de este estudio fue identificar variantes genéticas predictivas de respuesta a risperidona en genes potencialmente implicados, en pacientes con un episodio agudo de esquizofrenia, durante el tiempo que estuvieron ingresados y en el contexto habitual de politerapia de estos pacientes.

Las variantes genéticas investigadas se seleccionaron en base al conocimiento actual sobre su posible implicación en la respuesta a risperidona, a partir de las incluidas en *PHARMAChip*® y las descritas en las bases de datos. De este modo, se incluyeron variantes implicadas en la farmacocinética (*CYP2D6*, *CYP3A4*, *MDR1*) o en la farmacodinamia de risperidona (*ADRA1*, *DRD2*, *DRD3*, *HTR2A*, *HTR2C*) (Ficha técnica de la risperidona), así como variantes previamente descritas asociadas a la respuesta a este fármaco *ADRB1* (*PharmGKB*), *BDNF* (Lane et al., 2006), *COMT* (Fijal et al., 2009) *HTR1A* (Mossner et al., 2009), *HTR6* (Lane et al., 2006), *SLC6A4* (Vazquez-Bourgon et al., 2010) o potencialmente relacionadas (*ADRB2*, *GRIN2B*).

De las variantes no incluidas en *PHARMAChip*® se seleccionaron aquellas con mayor probabilidad de estar implicadas en la respuesta a risperidona, por haber sido asociadas previamente a la misma en diversos estudios.

La *tabla D3* muestra los genes estudiados en relación con la respuesta a risperidona, en este y otros estudios y las asociaciones observadas.

El estudio no se corrigió por comparaciones múltiples por el limitado tamaño muestral del mismo y por lo tanto, la baja potencia estadística asociada, lo que tendría como consecuencia aumentar la probabilidad de falsos negativos. Además, por ser la mayoría de las asociaciones genotipo-fenotipo investigadas exploratorias y basadas en una hipótesis previa, se consideró la significación estadística como  $p \leq 0,050$ .

Genes	Variables dependientes	Referencias	Resultados del presente estudio
<i>APO, LPL</i>	Factores de riesgo cardiovascular	(Smith et al., 2008) (Clark et al., 2009)	No estudiado
<i>BDNF</i>	Respuesta Aumento del IMC	(Lane et al., 2006) (Xu et al., 2010)	No asociación significativa
<i>COMT</i>	Respuesta	(Kang et al., 2010) (Fijal et al., 2009)	No asociación significativa
<i>CYP2D6</i>	Prolongación QT Farmacocinética Aparición EAs	(Lane et al., 2006)	Asociado a tensión interna y a mejor respuesta a risperidona
<i>DRD2</i>	Respuesta Hiperprolactinemia	(Lencz et al., 2006) (Calarge et al., 2009a) (Young et al., 2004) (Ikeda et al., 2008) (Yamanouchi et al., 2003)	Asociado a dolor de cabeza
<i>DRD3</i>	Respuesta SEP	(Kim et al., 2008) (Szekeres et al., 2004) (Lane et al., 2005)	Asociado a somnolencia, SEP, dificultad de concentración e hipotensión ortostática.
<i>HTR1A</i>	Respuesta	(Mossner et al., 2009)	No asociación significativa
<i>HTR2A</i>	Respuesta Aumento del IMC	(Lane et al., 2002) (Lane et al., 2006) (Kim et al., 2008)	Asociado a hipotensión ortostática.
<i>HTR2C</i>	Respuesta Aumento del IMC	(Lane et al., 2006) (Mulder et al., 2009)	No asociación significativa
<i>HTR6</i>	Eficacia Aumento de peso	(Lane et al., 2006)	No asociación significativa
<i>LEP</i>	Síndrome metabólico Aumento del IMC Aumento de peso	(Calarge et al., 2009b) (Ruaño et al., 2007)	No estudiado
<i>MDR1</i>	Polidipsia. Respuesta Aumento del IMC	(Xing et al., 2006) (Shinkai et al., 2008)	Asociado a estreñimiento, dependencia a fármacos y a mejor respuesta a risperidona.
<i>RGS2</i>	SEP	(Greenbaum et al., 2009)	No estudiado
<i>SLC6A4</i>	Respuesta	(Wang et al., 2007) (Dolzan et al., 2008) (Vazquez-Bourgon et al., 2010)	Asociado a ganancia de peso, estreñimiento, efectos adversos sexuales y problemas de acomodación

**Tabla D3. Genes más investigados en relación con la respuesta a risperidona y variables estudiadas.**  
**IMC: Índice de masa corporal; QT se refiere al intervalo electrocardiográfico del mismo nombre;**  
**EAs: Efectos adversos; SEP: Síntomas extrapiramidales**

### 3.1. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE SEGURIDAD DE RISPERIDONA

En relación con los efectos adversos, se encontró una incidencia muy alta entre los pacientes, con la presencia de al menos un efecto adverso en más del 90% de ellos.

Aproximadamente el 50% de los efectos adversos incluidos en la escala UKU se presentaron en los pacientes con una frecuencia mayor del 10% y fueron éstos los que se estudiaron (*tabla R4*). De ellos, la ganancia de peso (Lane et al., 2006) (Mulder et al., 2009), los efectos extrapiramidales (SEP) (Gasso et al., 2009) o la poliuria (Shinkai et al., 2008) han sido los más estudiados, por considerarse los más frecuentes o incapacitantes (Kapur & Remington, 2001) (Gardner et al., 2005).

En este estudio, sin embargo, el efecto secundario más frecuente fue la somnolencia, en más del 50% de los pacientes, en el que tras la regresión logística se confirmó el papel del alelo 9Gly de *DRD3* (Ser/Gly+Gly/Gly) como factor de riesgo, después de considerar las posibles variables de confusión. Este efecto, asociado al bloqueo histaminérgico de los antipsicóticos atípicos (Florez et al., 2003) puede ser debido a la alteración de otros sistemas neurotransmisores ya que, se sabe que el sistema sueño-vigilia comprende, además de las neuronas histaminérgicas, neuronas excitadoras glutamatérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas (McCarley, 1982) (Gvilia, 2010), lo que apoyaría los hallazgos de este trabajo.

El genotipo Ser/Gly de *DRD3* también resultó ser un factor de riesgo para la dificultad de concentración, incluido en la categoría de efectos psíquicos de la UKU (Lingjaerde et al., 1987) y posible consecuencia de la somnolencia. El que solo se asociara el genotipo heterocigoto pudo ser debido a que se presenta este efecto adverso con menor frecuencia que la somnolencia en los pacientes y que, al ser el genotipo Gly/Gly de *DRD3* el minoritario, no se alcanzase la significación estadística tras estratificar la población según los genotipos, debido al bajo tamaño de la muestra.

Al contrario que la somnolencia, uno de los efectos adversos más estudiados en relación con el tratamiento con risperidona es el aumento de peso que experimentan los pacientes (Gardner et al., 2005) ya que, además de ser frecuente, puede ser motivo del abandono del tratamiento (Lane et al., 2006) (Lieberman et al., 2005). A pesar de que el mecanismo no está del todo claro, se ha sugerido que los sistemas serotoninérgico e histaminérgico estarían implicados (Wirshing et al., 1999). Así, los genes más

estudiados en relación al aumento de peso derivado del tratamiento con risperidona han sido *HTR2A*, *HTR2C* o *BDNF* (Lane et al., 2006) asociado además al control del peso y al comportamiento alimentario en anorexia o bulimia (Ribases et al., 2004) o el gen de la leptina (*LEP*), implicado en la regulación del apetito y homeostasis energética (Calarge et al., 2009b) (*tabla D3*). En este estudio, se encontró asociado como factor protector frente a la ganancia de peso el genotipo S/S de *SLC6A4*, perteneciente al sistema serotoninérgico, lo que estaría en línea con la hipótesis de la implicación de la neurotransmisión serotoninérgica en el aumento de peso secundario a risperidona. Además entre los factores de riesgo no genéticos evaluados en este trabajo el consumo de anticolinérgicos estaría asociado a una mayor frecuencia de pacientes con aumento de peso (*tabla R17*).

Otro de los efectos adversos más estudiados en relación con la farmacogenética de los antipsicóticos, por ser especialmente frecuentes en el tratamiento con risperidona y altamente limitante, es la aparición de SEP (Kapur & Remington, 2001). Los SEP se derivan del bloqueo dopaminérgico a nivel de la vía nigroestriada (Kapur et al., 2000) y a pesar de que prácticamente no existen receptores D3 a nivel estriado, risperidona es uno de los antipsicóticos atípicos que más afinidad muestra por este tipo de receptores y que más SEP causa (Kapur & Remington, 2001).

A un menor riesgo de desarrollar este tipo de efectos adversos se asoció el alelo 9Gly de *DRD3* (Ser/Gly+Gly/Gly), que se ha sugerido que aumenta la afinidad y la eficacia de la dopamina por el receptor D3 (Lundstrom & Turpin, 1996) (Jeanneteau et al., 2006). Su asociación con los efectos adversos motores secundarios a tratamiento antipsicótico ha proporcionado resultados contradictorios sobre el papel de esta variante en la susceptibilidad a los mismos. Así, se ha descrito tanto un incremento en el riesgo de padecerlos como un papel protector del alelo 9Gly (Al Hadithy et al., 2009). No obstante, en la mayoría de los estudios la asociación no ha resultado significativa (Gunes, Scordo, Jaanson, & Dahl, 2007) (Guzey, Scordo, Spina, Landsem, & Spigset, 2007) (Gasso et al., 2009) (Gasso et al., 2010b).

Además, los SEP resultaron ser dependientes de la dosis de risperidona en este trabajo de acuerdo con previos estudios, (Riedel et al., 2005).

Por otro lado, a pesar de que los efectos adversos sexuales son muy comunes en el tratamiento antipsicótico y además son considerados por los pacientes como los más



discapacitantes, incluso más que la sedación, los SEP o los efectos vegetativos (Lambert et al., 2004), no existen estudios farmacogenéticos sobre este tipo de efectos adversos con risperidona hasta la fecha, pese a que este fármaco uno de los que más alteraciones sexuales produce (Bobes et al., 2003) (Gardner et al., 2005).

En este trabajo se encontró por primera vez el alelo S de *SLC6A4* asociado a una menor expresión del transportador de serotonina (Heils et al., 1996), como factor protector de disminución de la libido (L/S+S/S), en particular, y de efectos adversos sexuales en general (L/S), en pacientes en tratamiento con risperidona. Estos resultados apoyarían la asociación previamente descrita entre el alelo L y un mayor riesgo de disfunción sexual secundaria al tratamiento antidepresivo (Bishop, Ellingrod, Akroush, & Moline, 2009).

Además se encontró que el alelo 16Gly de *ADRB2* (Arg/Gly+Gly/Gly), que ha sido asociado a una menor densidad y eficiencia de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Ellsworth et al., 2002), actuó como factor de riesgo. *ADRB2* se incluyó en el estudio, a pesar de no tener, *a priori*, ninguna relación con la risperidona, por pertenecer al sistema de neurotransmisión adrenérgica, implicada en la respuesta a este fármaco (Jarskog et al., 2007). Aparte de los factores genéticos, también se asoció con un mayor riesgo el consumo concomitante de antidepresivos (OR=2,5) los cuales se ha descrito que producen este tipo de efectos (Hurtado, Escrivá, Catalán, & Mir, 2002).

Se ha sugerido que la causa común de los efectos adversos sexuales secundarios a antipsicóticos es la hiperprolactinemia derivada del bloqueo dopaminérgico D2 (Liu-Seifert, Kinon, Tennant, Sniadecki, & Volavka, 2009). No obstante, en la función sexual participa además el sistema adrenérgico, implicado en la erección y la eyaculación, y el serotoninérgico cuyos efectos podrían producir anorgasmia, inhibir la eyaculación y relajar la musculatura lisa del tejido eréctil (Zajacka, Fawcett, Schaff, Jeffriess, & Guy, 1991), además de inhibir la transmisión adrenérgica (Hurtado et al., 2002). Esto apoyaría el papel de *ADRB2* como factor de riesgo por alterar la transmisión adrenérgica y el papel de *SLC6A4* como factor protector por minimizar los efectos de la serotonina sobre la función sexual y la transmisión adrenérgica.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que, la variante Arg16Gly de *ADRB2* fue la única que no cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,050$ ), por lo que estos resultados deben ser confirmados en una población independiente.

Los mareos/hipotensión ortostática y el estreñimiento observado en los pacientes en tratamiento con antipsicóticos son efectos vegetativos causados por el bloqueo de receptores dopaminérgicos,  $\alpha$ -adrenérgicos, serotoninérgicos e histaminérgicos a nivel periférico (Florez et al., 2003). En este estudio, aparecen como factores de riesgo para los mareos ortostáticos el alelo 9Gly de *DRD3* y el genotipo His/Tyr *HTR2A* (no hubo homocigotos para el alelo 452Tyr). Se ha descrito que estas variantes en *DRD3* y *HTR2A* alteran la función de los receptores que codifican (Lundstrom & Turpin, 1996) (Hazelwood & Sanders-Bush, 2004). Eso apoyaría el papel de estas variantes significativas en la asociación con el aumento del riesgo de mareos ortostáticos, que es hasta siete veces mayor en el caso del alelo 9Gly de *DRD3*.

Por otro lado se encontró el alelo 2664T de *GRIN2B* (C/T+T/T) asociado a un menor riesgo de desarrollar este efecto adverso. *GRIN2B*, componente de la transmisión glutamatérgica, se incluyó en el estudio por haber sido asociado este sistema neurotransmisor con la respuesta a risperidona (Fijal et al., 2009). Además, esta variante en la región codificante de *GRIN2B* se ha asociado a discinesia tardía secundaria al tratamiento con clozapina (Liou et al., 2007).

La interconexión existente entre los diferentes sistemas de neurotransmisión apoyaría la asociación de estas variantes genéticas con los mareos ortostáticos, que también se asociaron con el consumo de antidepresivos (OR=4,6).

En el caso del estreñimiento también una menor transmisión serotoninérgica y en consecuencia, el menor bloqueo de sus receptores a nivel periférico, podrían explicar la asociación encontrada entre el alelo S de *SLC6A4* (L/S+S/S) con un menor riesgo de este síntoma en los pacientes esquizofrénicos.

Otras asociaciones encontradas fueron el genotipo 4155 G/G de *ADRA1*, diana farmacodinámica de risperidona, con una menor presencia de astenia, para la cual el consumo de benzodiazepinas contribuyeron en aumentar el riesgo (OR=2,2); y el fenotipo metabolizador intermedio de CYP2D6 que presenta 7 veces más riesgo de padecer tensión/inquietud interna como efecto derivado del tratamiento con risperidona.

Además, la variante Taq1A1 de *DRD2* y el alelo 2664T de *GRIN2B* resultaron ser factores protectores para el dolor de cabeza.

Por otro lado, el genotipo T/T de *GRIN2B* confirió hasta 20 veces más riesgo de depresión comparado con los homocigotos silvestres. Este gen está implicado en la transmisión glutamatérgica cuya alteración se ha asociado en numerosos estudios a la etiología de la depresión, revisado en (Mitchell & Baker, 2010).

También este genotipo se asoció a un mayor riesgo de dependencia psíquica a los fármacos. Por el contrario el alelo 3435T de *MDR1* resultó ser un factor protector para la misma.

Por último, el alelo S de *SLC6A4* (L/S+S/S) confirió protección al desarrollo de problemas de acomodación.

### 3.2. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE EFICACIA DE RISPERIDONA

Otro de los objetivos del estudio fue evaluar la influencia de las variantes genéticas en la mayor o menor eficacia de risperidona, medida como porcentaje de cambio en la escala PANSS durante el ingreso. La variable respuesta como cambio en la escala PANSS ha sido ampliamente utilizada en los estudios farmacogenéticos de risperidona, a la que se han asociado genes de la transmisión dopaminérgica como *COMT* (Gupta et al., 2009) *DRD2* y *DRD3* (Lencz et al., 2006) (Szekeres et al., 2004) (Ikeda et al., 2008) (Lane et al., 2005), serotoninérgica como *HTR1A* (Mossner et al., 2009), *HTR2A* (Yamanouchi et al., 2003) o *BDNF* (Xu et al., 2010), además de otros como *CYP2D6* (Correia et al., 2010) o *MDR1* (Xing et al., 2006) (tabla D1). No obstante, la mayoría de los resultados obtenidos en unos estudios no se replican en otros.

En este trabajo, los metabolizadores lentos de *CYP2D6* mostraron una mejoría significativamente mayor que el resto de los fenotipos en las escalas total y negativa de PANSS.

Se ha descrito una clara relación entre el número de alelos activos de *CYP2D6* y los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de risperidona y su metabolito, 9-OH-risperidona (Novalbos et al., 2010). Así, en un estudio realizado por Novalbos y colaboradores, se encontró que los metabolizadores lentos de *CYP2D6* tuvieron un menor aclaramiento de risperidona y muy bajas concentraciones de 9-OH risperidona al compararlos con los metabolizadores normales (Novalbos et al., 2010). Por otro lado, a

pesar de que se ha descrito que ambos compuestos tienen similar actividad farmacológica, existen otros que señalan la diferente potencia y afinidad de ambos compuestos por sus receptores, siendo risperidona más potente y tóxica que su metabolito hidroxilado (de Leon, Wynn, & Sandson, 2010). Esta superioridad de risperidona en cuanto a la potencia podría explicar la mejor respuesta observada en los metabolizadores lentos, cuyas concentraciones de risperidona respecto de 9-OH risperidona son mucho mayores que en los metabolizadores normales (Novalbos et al., 2010). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el número de metabolizadores lentos incluidos en este trabajo es de tres y por lo tanto estos resultados deben ser confirmados en una población de mayor.

En cualquier caso, el papel de las variaciones genéticas en *CYP2D6* en la respuesta a risperidona aún no se conoce con exactitud, con autores que consideran que no existe correlación con la eficacia o seguridad del fármaco (Kakihara et al., 2005) (Scordo et al., 1999) (Plesnicar, Zalar, Breskvar, & Dolzan, 2006) (Yasui-Furukori et al., 2004) (Wang et al., 2007) y solo algunos señalan su importancia en cuanto a la mayor incidencia de efectos adversos (de Leon et al., 2005) (Correia et al., 2010) (Novalbos et al., 2010).

Por otro lado también es diferente la afinidad que muestran risperidona y 9-OH risperidona por sus diversos receptores. En concreto por la glicoproteína P, codificada por *MDR1*, asociado en este trabajo a una mejor respuesta, risperidona tiene una mayor afinidad que 9-OH-risperidona (de Leon et al., 2010).

La glicoproteína P es una bomba que regula el acceso de fármacos a través del cerebro, riñón, intestino o hígado. Estudios *in vitro* sugieren que risperidona muestra una alta afinidad por esta proteína y superior a otros antipsicóticos atípicos (Boulton, DeVane, Liston, & Markowitz, 2002) y que además, determina, en gran medida, su entrada al cerebro (Wang et al., 2004). Se ha visto que ratones *knock-out* para glicoproteína P presentan mayores concentraciones de risperidona y su metabolito en el cerebro (Wang et al., 2004). De esto se deduce que variaciones a nivel genético en esta proteína podrían tener impacto en las concentraciones intracerebrales de risperidona.

Por otro lado, el alelo T de la variante 3435C>T localizada en el exón 26 de *MDR1* se ha asociado a una menor expresión de glicoproteína P (Hoffmeyer et al., 2000) y en este

trabajo a una mejor respuesta en la escala total de PANSS. Esto explicaría la mejoría observada en los pacientes portadores de este alelo, ya que podrían presentar mayores concentraciones como consecuencia de un mayor acceso de risperidona al cerebro, con un consiguiente mayor bloqueo serotoninérgico y dopaminérgico y, por lo tanto, una mayor respuesta.

El estudio de respuesta a risperidona en relación con los síntomas positivos de la esquizofrenia utilizando la escala PANSS-P, no proporcionó ningún marcador genético predictivo, posiblemente debido al bajo tamaño muestral estudiado y a la transformación de esta escala continua en una variable categórica, lo que conduce, en ambos casos, a un análisis con menor potencia estadística (Fijal et al., 2009).

### 3.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La heterogeneidad genética encontrada en relación con los distintos efectos adversos estudiados apoya la hipótesis de la participación de múltiples genes implicados en diversas vías biológicas y sus interacciones como responsables del fenotipo. Además pone en evidencia que las alteraciones genéticas responsables de la disrupción de las vías implicadas en la respuesta terapéutica pueden no ser las mismas en todos los individuos o poblaciones.

De entre las variantes genéticas incluidas en el análisis, hubo varias para las que no se observó asociación con los efectos adversos o la eficacia de risperidona. Estas variantes fueron Arg389Gly de *ADRB1*, -563C>T y -4884G>A de *ADRA1*, Val66Met del gen *BDNF*, Val158Met del gen *COMT*, el alelo \*1B de *CYP3A4*, *HTR1A* -1019 C>G, *HTR2A* -102C>T y *HTR6* 267C>T.

La falta de asociación de variantes previamente relacionadas con respuesta a risperidona (*tabla D3*) puede explicarse por presentar este trabajo una serie de limitaciones, que por lo general suelen ser comunes a todos los estudios farmacogenéticos realizados en esquizofrenia (Fijal et al., 2009) (Smith et al., 2008) (Calarge et al., 2009b) (Gasso et al., 2010b).

La primera de las limitaciones de este trabajo es el tamaño de la muestra de los pacientes seleccionados y su heterogeneidad. Por un lado, el número de pacientes hace que este estudio tenga una potencia estadística limitada para detectar asociaciones en las que el riesgo proporcionado por las variantes genéticas es pequeño. Se ha sugerido que el fenotipo de respuesta a los fármacos antipsicóticos como risperidona es complejo y que en él intervienen varios genes de vías diferentes interconectadas entre sí, con efectos desde moderados a pequeños sobre el riesgo global (Daly, 2010), que para detectarlos se necesitan tamaños muestrales grandes. En concreto en nuestro estudio, el OR mínimo que se podría detectar, con una potencia adecuada (80%) para el efecto adverso más frecuente (la somnolencia con un 56,7%), en el caso de asociación con el genotipo de mayor frecuencia (0,695), es de aproximadamente 4 y aumenta al disminuir la frecuencia del efecto adverso o genotipo estudiados. Por lo tanto para detectar ORs menores se necesitaría un tamaño muestral significativamente mayor.

De hecho, como puede observarse en la *tabla R17*, las variantes genéticas significativamente asociadas a los fenotipos proporcionan riesgos relativamente altos. Por ello se podría suponer que otras variantes genéticas estudiadas, que podrían proporcionar un riesgo menor al fenotipo respuesta, no son detectadas como asociaciones significativas con el tamaño muestral empleado.

Por otro lado, los pacientes incluidos fueron ingresados en psiquiatría con un episodio agudo de esquizofrenia, bien en el debut o con una exacerbación de la enfermedad. Esto tiene como consecuencia que la duración de la enfermedad en cada paciente es distinta y por lo tanto, el tiempo de exposición a un posible tratamiento antipsicótico previo. A esto hay que sumar que estos pacientes recibieron dosis de risperidona diferentes, de acuerdo a la gravedad de su episodio, y en la mayoría de los casos, tratamientos concomitantes al tratamiento antipsicótico, durante el tiempo de ingreso, que también fue variable en los pacientes.

Todo esto resulta en una muestra de pacientes heterogénea, lo que hace que, a pesar de haber sido minimizada con la inclusión de factores demográficos y clínicos, resulte compleja la definición de los fenotipos y, por lo tanto, menos clara su asociación con el fármaco en estudio.

No obstante, esta heterogeneidad es propia de la enfermedad y del manejo terapéutico de la misma, y se asumió desde un primer momento, ya que el objetivo del trabajo fue obtener información farmacogenética en el contexto real de la práctica clínica psiquiátrica habitual en un episodio agudo de esquizofrenia. En muchos de los estudios farmacogenéticos en psiquiatría, el tratamiento antipsicótico que se evalúa se administra a los pacientes en monoterapia y monodosis, excluyendo de los estudios aquellos pacientes que no cumplen este requisito (Xu et al., 2010) (Ikeda et al., 2008) (Ryu et al., 2007) (Reynolds et al., 2005). Esta situación no es la habitual en el tratamiento de la esquizofrenia, en cuya respuesta intervienen, además de los factores de riesgo genéticos, otros factores que pueden modificarlos (Florez et al., 2003), y que muchos de los estudios farmacogenéticos no consideran (Correia et al., 2010) (Fijal et al., 2009). Por lo tanto, este estudio se aproxima más a la realidad terapéutica de los pacientes.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios farmacogenéticos sobre risperidona publicados hasta la fecha muestran una gran inconsistencia. La causa de que los marcadores genéticos encontrados en unos estudios no se confirmen en otros es debido, en parte, a características propias de la enfermedad y de su diagnóstico (Fijal et al., 2009) y al diseño de los estudios farmacogenéticos en los que los pacientes estudiados no son, por lo general, homogéneos (Fijal et al., 2009) (Smith et al., 2008) (Calarge et al., 2009b) (Gasso et al., 2010b).

En primer lugar, uno de los principales problemas de los estudios farmacogenéticos en psiquiatría radica en la dificultad de establecer un diagnóstico preciso, ya que las enfermedades psiquiátricas suelen ser síndromes compuestos por síntomas que comparten la mayoría de ellas (van Os & Kapur, 2009). A esta heterogeneidad propia de esta patología, hay que añadir la que se produce como consecuencia de una selección de pacientes no homogéneos, en ocasiones incluso reclutando pacientes con distintas patologías para estudios farmacogenéticos y asumiendo que los mecanismos de respuesta a los fármacos son iguales (Fijal et al., 2009).

Por otro lado, a pesar de haber sido descrito que la variación en el genoma humano muestra variabilidad inter e intra-étnica (Ingelman-Sundberg et al., 2007) muchos de los estudios incluyen pacientes de diferentes etnias (Calarge et al., 2009b) (Lencz et al., 2006) (Anderson et al., 2007) (Mulder et al., 2009), lo que disminuye la probabilidad de

encontrar una asociación genotipo-fenotipo significativa y de replicarla en otras poblaciones, en el caso de encontrarse. A esto hay que añadir que muchos de los estudios farmacogenéticos no evalúan el efecto de un único antipsicótico sino que reclutan pacientes en tratamiento con diversos fármacos, cuyos efectos se consideran iguales (Vazquez-Bourgon et al., 2010) (Gasso et al., 2010b) (Ryu et al., 2007). A pesar de que los antipsicóticos atípicos son similares entre sí, existen diferencias en sus perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos (Jarskog et al., 2007) y por lo tanto, considerarlos iguales aumenta la heterogeneidad de la muestra, ya significativa *a priori*. Esto hace que los resultados obtenidos en un estudio no sean extrapolables a otros ya que el efecto de las variantes genéticas en la respuesta a cada uno de los antipsicóticos es probablemente diferente.

Asimismo, muchas de las variantes genéticas asociadas al fenotipo respuesta solo han sido investigadas en un estudio y cuando se hace en más de uno, generalmente los resultados se contradicen (Fijal et al., 2009). Además de los factores mencionados anteriormente, la principal causa de la ausencia de replicación es el uso de tamaños muestrales insuficientes para detectar el efecto que la variante genética tiene sobre el fenotipo y, por tanto, muchas de las asociaciones encontradas son en realidad falsos positivos.

En conclusión, la heterogeneidad genética de los fenotipos estudiados en este trabajo y en la mayoría de estudios farmacogenéticos realizados sugieren que la respuesta terapéutica a risperidona podría ser el resultado de alteraciones de varias vías biológicas implicadas en su mecanismo de acción, a través de la presencia de variantes genéticas funcionales localizadas en diversos genes. Este carácter poligénico hace que la estrategia más robusta para esclarecer las bases genéticas de la respuesta a risperidona implique el estudio de múltiples variantes funcionales en vías implicadas en la farmacocinética y farmacodinamia, además de otras vías relacionadas. Esto debe ir acompañado de una mejor selección de los pacientes para minimizar la heterogeneidad intrínseca al manejo terapéutico de la esquizofrenia y de tamaños muestrales mayores, que aseguren una potencia estadística suficiente para detectar el efecto de las variantes genéticas en la respuesta a risperidona.

En relación con los resultados obtenidos en este trabajo, estos deben ser replicados en una población independiente con mayor tamaño muestral que proporcionen una



potencia estadística adecuada y homogéneas en cuanto a la patología, el tratamiento o la etnia. La confirmación de la utilidad clínica de los marcadores genéticos descritos como predictores de la respuesta a risperidona, es requisito indispensable para la utilización de la farmacogenética en manejo de estos pacientes, en los cuales a pesar del amplio uso de este fármaco, es imposible predecir la respuesta clínica de manera individual (Zalsman et al., 2003). Esto tiene como consecuencia que en muchos casos los pacientes abandonen sus tratamientos debido a la falta de eficacia o toxicidad, lo que tiene un impacto negativo en la sociedad por incrementarse los costes sanitarios y la pérdida de productividad de los pacientes (Himei & Okamura, 2005).

#### **4. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL CON LA ESQUIZOFRENIA**

Estudios familiares en gemelos monocigotos apoyan el importante papel que tienen los factores genéticos en el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Sullivan, 2005). En la actualidad, a pesar de que existen más de 1000 estudios de asociación genética con la esquizofrenia (de ligamiento, de asociación de genes candidatos o de genoma completo -GWAS-), en los que se han descrito más de 3000 variantes en más de 500 genes asociadas a esquizofrenia, aún no se ha encontrado un marcador de susceptibilidad genética definitivo (Allen et al., 2008). Si bien estos estudios muchas veces no han sido replicados, sí demuestran que la etiología de la esquizofrenia implica a varios genes/*loci*, con variantes genéticas comunes y raras, que participan en el riesgo global de la enfermedad (Purcell et al., 2009).

Con objeto de encontrar entre las variantes genéticas incluidas en *PHARMAChip*® un posible factor de riesgo para la esquizofrenia, se realizó en este trabajo un estudio de asociación caso-control. La selección de las variantes genéticas se apoyó en la base de datos *Schizophrenia Gene Resource* (SZGR) que contiene más de 7800 genes procedentes de todos los estudios de asociación genética con la esquizofrenia realizados hasta la fecha. En concreto, consta de un conjunto de 281 genes candidatos significativos tras un meta-análisis de todos los genes incluidos en la base de datos *SchizophreniaGene Database* (Sun, Kuo, Riley, Kendler, & Zhao, 2008) (Allen et al., 2008).

##### **4.1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL CON LA ESQUIZOFRENIA Y LOS HAPLOTIPOS DEL PROMOTOR DEL GEN IL-10**

En este estudio se describe por primera vez la asociación del genotipo ATA/ATA del gen *IL-10* con la esquizofrenia en mujeres españolas. Esto pone en evidencia, una vez más, el papel del sistema inmune en la etiología de la esquizofrenia, a la que se han asociado marcadores genéticos localizados en el complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA) (Stefansson et al., 2009), o en diversas citoquinas (Sun et al., 2010) (Paul-Samojedny, 2010) (Allen et al., 2008) (Potvin et al., 2008).

ATA es el haplotipo formado por los SNPs en las posiciones -1082 (G>A), -819 (C>T) y -592 (C>A) del promotor del gen *IL-10* (Turner et al., 1997). En caucásicos estos

polimorfismos definen solamente tres haplotipos, GCC, ACC y ATA responsables de diferentes tasas de producción de IL-10, siendo GCC el haplotipo asociado a una mayor y ATA a una menor producción de IL-10 (Edwards-Smith et al., 1999).

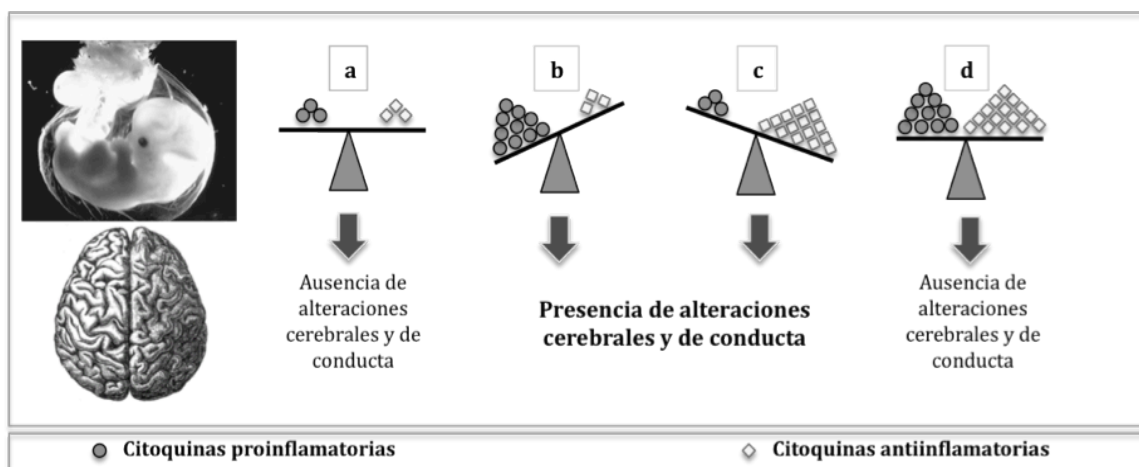
IL-10 es una citoquina antiinflamatoria, cuyo papel en la esquizofrenia a nivel genético ha sido investigado en varias poblaciones (Bocchio Chiavetto et al., 2002) (Paul-Samojedny et al., 2010) y los resultados contrastan con los encontrados en este trabajo. El trabajo de Bocchio Chiavetto describe una asociación significativa del alelo -1082G y del haplotipo GCC con la esquizofrenia. Sin embargo, cabe destacar que las frecuencias alélicas de la población seleccionada como control son significativamente diferentes a las publicadas en caucásicos (HapMap acceso enero 2011). Por lo tanto, este resultado puede deberse más a un sesgo en la selección de la población control que a una asociación verdadera. En el caso del estudio realizado en población polaca que también describe la asociación del alelo G con la esquizofrenia, solamente se reclutaron pacientes con subtipo paranoide de esquizofrenia y la asociación exclusivamente se observó en hombres (Paul-Samojedny et al., 2010).

El papel de las citoquinas como mediadores del sistema inmune en la etiología de la esquizofrenia está siendo ampliamente estudiado (Kronfol & Remick, 2000) (Potvin et al., 2008) (Meyer, Feldon, & Yee, 2009). La familia de las citoquinas incluye un gran número de proteínas implicadas, mediante complejas interacciones, en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria en condiciones fisiológicas y patológicas (Steinke & Borish, 2006). Existen diferentes miembros de esta familia de acuerdo a los sitios de producción y funciones en el sistema inmune periférico. Así, se consideran citoquinas proinflamatorias IL-1B, IL-6 y TNF ya que tienen un importante papel en la defensa inmediata frente a agentes infecciosos y en la iniciación y progresión de la inflamación, y citoquinas antiinflamatorias, IL-10 y TGF- $\beta$ , por regular la producción de las proinflamatorias y por lo tanto ser imprescindibles para la homeostasis de las citoquinas y demás células del sistema inmune (Meyer et al., 2009).

Por otro lado, se sabe que las citoquinas y sus receptores se expresan, en las células gliales del sistema nervioso central en el adulto (Hopkins & Rothwell, 1995) y además, muchas de ellas, entre las que se encuentra IL-10, lo hacen durante el desarrollo fetal de manera constitutiva en humanos (Mousa, SeigerA, Kjaeldgaard, & Bakhet, 1999).

Esto último ha llevado a postular varias hipótesis sobre la posible relación entre las alteraciones de estas citoquinas y las infecciones maternas durante el periodo prenatal (Gilmore & Jarskog, 1997), ya que estos mediadores son el factor común de la respuesta inmune a una multitud de agentes infecciosos (Meyer et al., 2009), asociados a un incremento en el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Brown et al., 2004). Una de las teorías propuestas es la inducción de citoquinas proinflamatorias por el sistema inmune materno en respuesta a una infección como responsable de alteraciones cerebrales que conducen al desarrollo de esquizofrenia en la descendencia (Gilmore & Jarskog, 1997).

En la actualidad, la hipótesis de Gilmore ha sido ampliada a que más que un exceso de señalización proinflamatoria, es la alteración en el balance entre la señalización proinflamatoria y antiinflamatoria, innata o en respuesta a una infección materna, la responsable de las anomalías en el neurodesarrollo implicadas en esquizofrenia (Meyer et al., 2009). También se ha propuesto que el balance entre ambas clases de citoquinas es uno de los factores implicados en el desarrollo normal durante la etapa prenatal de las funciones del cerebro adulto (*figura D2*) (Meyer et al., 2009).



**Figura D2.** Modelo propuesto por Meyer y colaboradores de la modulación del cerebro y el comportamiento en el adulto por un desequilibrio de citoquinas en el cerebro fetal. a) Balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias el desarrollo cerebral normal en la etapa prenatal. b) Un exceso en los niveles de citoquinas proinflamatorias o c) de citoquinas antiinflamatorias conduce a anomalías cerebrales y de la conducta. d) Inducción concomitante de ambos tipos de citoquinas que contrarresta los efectos por mantenerse el equilibrio entre las dos clases de citoquinas. Adaptado de Meyer et al., 2009

En concreto, y en línea con estos resultados, Meyer y colaboradores demostraron en ratones que las diferencias en la producción de IL-10 determinadas genéticamente podían conducir a anormalidades de comportamiento en la edad adulta, en caso de compromiso del sistema inmune durante el desarrollo fetal, por infecciones maternas o por un desequilibrio innato (Redlich et al., 2008). Además, un aumento innato en la expresión de IL-10 en la interfaz madre-feto podría atenuar las consecuencias de la exposición prenatal a citoquinas proinflamatorias producidas en respuesta a una infección (Meyer et al., 2009).

Este desequilibrio entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias genéticamente determinado (*figura D2b*) podía ser el responsable del incremento de hasta 5 veces en el riesgo observado en las mujeres portadoras del genotipo ATA/ATA, menor productor de IL-10. Existe evidencia reciente de que el haplotipo ATA de IL-10 conduce a una represión de la expresión de esta citoquina en trofoblastos humanos al compararla con el resto de haplotipos, sobre todo en el contexto de una infección intrauterina (Sharma et al., 2010). Así, con menor expresión innata de IL-10, el balance se vería alterado hacia un aumento de las citoquinas proinflamatorias que podría conducir a alteraciones en el cerebro fetal.

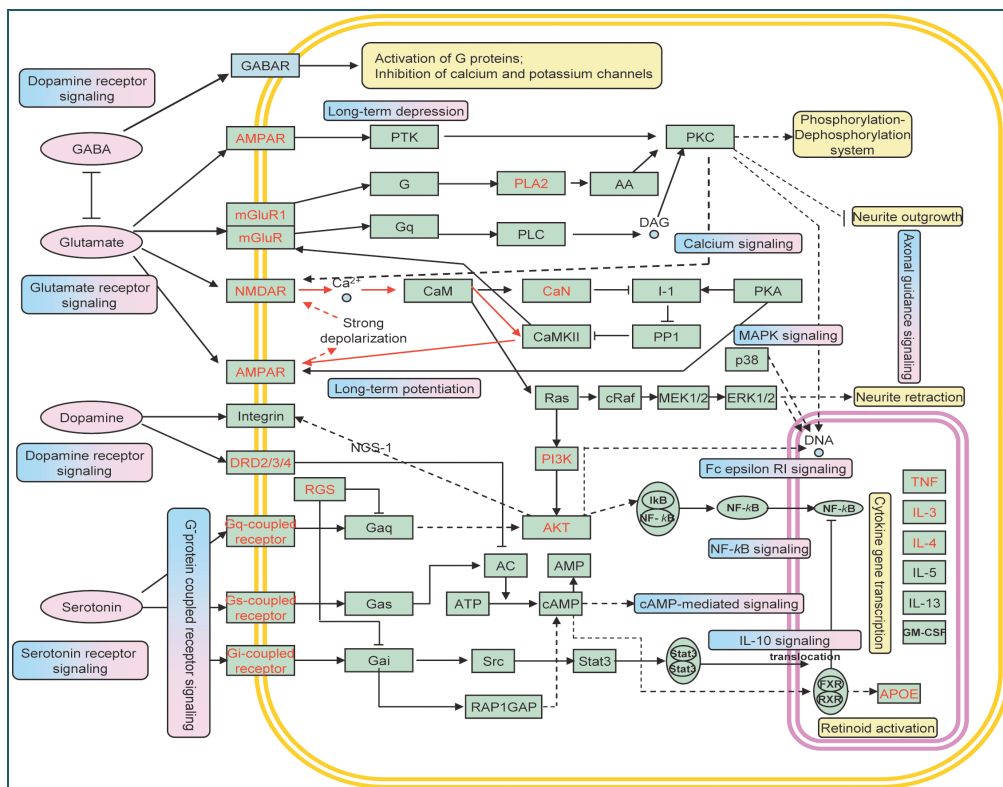
Las citoquinas proinflamatorias son neurotóxicas y se ha descrito que IL-1B, IL-6 y TNF $\alpha$  disminuyen la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas fetales *in vitro* (Jarskog, Xiao, Wilkie, Lauder, & Gilmore, 1997). Recientemente se ha descrito que la activación inmune prenatal podría ser un factor de riesgo en la disfunción dopaminérgica implicada en el comportamiento psicótico (Vuillermot, Weber, Feldon, & Meyer, 2010) y que la respuesta inflamatoria, sobre todo a través de IL-6, a una infección materna está asociada con un aumento en la morbilidad fetal, incluyendo el sistema nervioso central (Gomez et al., 1988).

El mecanismo por el cual las citoquinas maternas alcanzan el cerebro fetal se desconoce pero se sabe que estas atraviesan la placenta, paso más probable en el seno de una infección (Urakubo, Jarskog, Lieberman, & Gilmore, 2001), y regulan el crecimiento celular y el desarrollo fetal.

No obstante, la infección no es la única causa del incremento de las citoquinas proinflamatorias en el seno placentario, ya que se ha descrito que estos mediadores

podrían estar también implicados en las anomalías encontradas en fetos sometidos a malnutrición durante su desarrollo embrionario, considerado otro de los factores de riesgo ambientales de la esquizofrenia durante la etapa prenatal (Shen et al., 2008).

El importante papel que están adquiriendo las citoquinas como factor de riesgo en el desarrollo de esquizofrenia debe ser aún investigado a nivel de las vías biológicas en las que están implicadas ya que las enfermedades complejas como la esquizofrenia pueden resultar de la alteración de genes que participen en una o más vías biológicas (Jia, Wang, Meltzer, & Zhao, 2010). Con este razonamiento, recientemente Sun y colaboradores han diseñado la primera 'red molecular de esquizofrenia' (figura D3) utilizando una serie de genes previamente asociados a esquizofrenia (Sun et al., 2010). En esta red se encuentran representadas vías relacionadas con múltiples aspectos entre las que se encuentra la de señalización de IL-10 (figura D3). Esto, una vez más, pone en evidencia, la naturaleza poligénica de la esquizofrenia como resultado de un proceso dinámico causado por la desregulación de varias vías biológicas (Sun et al., 2010) y apoya el papel de *IL-10* como factor de riesgo de la enfermedad.



**Figura D3. Red molecular de la esquizofrenia desarrollada por Sun y colaboradores (Sun et al., 2010)**

Por otro lado, la asociación entre el genotipo asociado a una menor producción de IL-10, ATA/ATA, y la esquizofrenia solo se observó en mujeres. En relación con el fenotipo de la enfermedad, se han descrito diferencias en cuanto a la incidencia, edad de inicio, curso de la enfermedad, respuesta terapéutica, habilidades sociales e intelectuales y anormalidades cerebrales entre hombres y mujeres (Leung & Chue, 2000), por lo tanto, es plausible considerar también diferencias entre géneros a nivel genético. Asociaciones genéticas, específicas de un sexo, han sido descritas en diversos *loci* en la esquizofrenia (Hennah et al., 2003) (Shifman et al., 2008) (Tan, Chong, Wang, Chew-Ping Lim, & Teo, 2005) (Paul-Samojedny et al., 2010) (Chen et al., 2004). En cuanto a los mecanismos posiblemente implicados en estas diferencias se encuentra la influencia de factores epigenéticos, como el *imprinting* o los efectos que muchas hormonas tienen en la regulación de la expresión de determinados genes (Ostrer, 2001). En el caso de *IL-10*, o de genes que codifican citoquinas en general, existen receptores estrogénicos en ciertas células del sistema inmune responsables de la producción de IL-10 (Weusten et al., 1986).

No obstante, debido al limitado tamaño muestral de la población, especialmente tras la estratificación por sexo, esta asociación observada en mujeres debe ser replicada en una población independiente.

#### **4.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL CON LA ESQUIZOFRENIA Y LAS VARIANTES GENÉTICAS INCLUIDAS EN PHARMAChip®**

Ninguna de las asociaciones entre la esquizofrenia y el resto de las variantes investigadas alcanzó la significación estadística de  $p \leq 0,050$ , a pesar de encontrarse en genes descritos como candidatos tras el meta-análisis realizado por Allen y colaboradores (Allen et al., 2008).

Entre estos se encontraban genes relacionados con la transmisión dopaminérgica y serotoninérgica, tradicionalmente estudiados por ser las vías diana de los fármacos antipsicóticos clásicos y atípicos (Florez et al., 2003). En concreto la variante Val158Met del gen *COMT*, localizado en la región 22q11 que ha sido asociada a esquizofrenia en numerosas ocasiones, ha sido relacionada a una disminución en la

actividad de la Catecol-o-Metil Transferasa, la enzima que codifica, responsable del metabolismo de la dopamina. Esto da lugar a una mayor concentración de dopamina en la corteza prefrontal del cerebro en los portadores del alelo 158Met (Sawa & Snyder, 2002).

Por otra parte, la afinidad que muestran los antipsicóticos por el receptor D3 de la dopamina (Jarskog et al., 1997), junto con los niveles anormales del ARNm encontrados en linfocitos de pacientes esquizofrénicos y su localización en una región previamente ligada a esquizofrenia (3q13.3) (Nunokawa et al., 2010), han hecho que *DRD3* sea otro de los genes candidatos en la búsqueda de factores de riesgo genético de esquizofrenia. En concreto, la variante Ser9Gly, responsable de una alteración en la afinidad de la dopamina por su receptor (Lundstrom & Turpin, 1996), ha sido la más estudiada, aunque no se ha encontrado evidencia definitiva de su implicación en la enfermedad (Allen et al., 2008).

Del sistema serotoninérgico, especialmente, la variante 102C>T en *HTR2A*, asociada a una diferente expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza temporal (Polesskaya & Sokolov, 2002), ha sido sometida a varios meta-análisis en distintas poblaciones y los resultados sobre su asociación con la esquizofrenia son contradictorios (Abdolmaleky, Faraone, Glatt, & Tsuang, 2004) (Sanders et al., 2008). También perteneciente a este sistema, el VNTR en el promotor de *SLC6A4* que da lugar a los alelos L y S, relacionados con diferente expresión del gen (Heils et al., 1996), ha sido estudiado por su participación en la modulación sináptica de la serotonina, con resultados poco concluyentes (Allen et al., 2008) (Konneker et al., 2010).

Otro de los genes estudiados en este trabajo, *GRIN2B*, que codifica una de las subunidades del receptor N-metil D-aspartato (NMDA) de la transmisión glutamatérgica, ha sido investigado en relación con esquizofrenia en diversas poblaciones (Qin et al., 2005) (Ohtsuki et al., 2001) (revisado en Cherlyn et al., 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la participación del sistema inmune en la esquizofrenia se ha investigado ampliamente. *TNF $\alpha$*  codifica una citoquina proinflamatoria y cuya vía de señalización se ha descrito como una de las posibles implicadas en el desarrollo de la esquizofrenia (Jia et al., 2010). No obstante, los estudios realizados con variantes en este gen (incluido la estudiada en este trabajo, -



308G>A) no son concluyentes (Sun et al., 2008) (Czerski et al., 2008) (Watanabe et al., 2007).

También genes implicados en el metabolismo de xenobióticos, estudiados en relación con la esquizofrenia, han sido investigados en este trabajo sin resultados significativos. De ellos, *CYP1A2* se ha relacionado con el metabolismo de serotonina (Dutheil, Beaune, & Lorient, 2008) y la región cromosómica en la que se encuentra, 15q24, ha sido asociada a esquizofrenia en estudios de ligamiento (Freedman, 2003). Igualmente, en el caso de *CYP2D6*, por la presencia de la enzima que codifica en el cerebro y su interacción con neurotransmisores como dopamina y serotonina (Ozdemir et al., 2006), algunos estudios han descrito una menor frecuencia de metabolizadores lentos en pacientes esquizofrénicos respecto a individuos control. No obstante, otros trabajos no han encontrado tales diferencias (Llerena et al., 2007) (Dawson et al., 1994) (Jonsson, Dahl, Roh, Jerling, & Sedvall, 1998) (Kohlrausch et al., 2009).

Recientemente un estudio realizado por Gassó y colaboradores señalan la posible epistasia entre *CYP1A2* y *CYP2D6*, entre otros, en la regulación de la homeostasis y metabolismo cerebral y por tanto una posible implicación en procesos patológicos como la esquizofrenia (Gasso et al., 2010a).

También los dos CNVs estudiados en este trabajo en *GSTM1* y *GSTT1*, ambos implicados en la detoxificación de los metabolitos oxidados de las catecolaminas, producen una pérdida de función genética y podrían llevar a la acumulación de estos productos de oxidación y acabar en la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Smythies & Galzigna, 1998). Ambos han sido asociados a esquizofrenia en diversos estudios (Watanabe, Nunokawa, Kaneko, & Someya, 2010) (Rodríguez-Santiago et al., 2010) (Saadat, Mobayen, & Farrashbandi, 2007) (Matsuzawa et al., 2009) (Gravina et al., 2010).

Por último, existe evidencia de que variantes funcionales en el gen *MTHFR*, como 677C>T, responsables de un metabolismo alterado de homocisteína-folato, se encuentran asociadas a una diferente vulnerabilidad a varios trastornos psiquiátricos (Peerbooms et al., 2010) (Saetre et al., 2011).

La principal explicación para los resultados negativos observados en este trabajo podría ser el tamaño muestral utilizado. En la actualidad, se ha descrito que en el riesgo genético de la esquizofrenia participan variantes comunes contribuyendo con efectos pequeños y variantes raras con efectos mayores (Sebat, Levy, & McCarthy, 2009). Estos efectos pequeños, como los investigados en este trabajo, en términos de OR, requieren tamaños muestrales grandes para encontrar asociaciones significativas. Con el tamaño de la muestra incluida en este trabajo, solo es posible detectar con una potencia estadística adecuada ( $\geq 80\%$ ) la asociación de variantes genéticas presentes en una frecuencia en la población de al menos 0,500 con un  $OR \geq 1,6$ .

Desafortunadamente, las asociaciones genéticas encontradas en general, y en particular de las variantes genéticas previamente descritas con la esquizofrenia, son poco concluyentes. Esto es en parte debido a la heterogeneidad genética de la esquizofrenia, a la cual se han asociado miles de variantes en cientos de genes (Allen et al., 2008), que además se han asociado a otros trastornos psiquiátricos, como el trastorno bipolar u otros tipos de psicosis (Bertolino & Blasi, 2009).

A todo lo anterior hay que añadir la dificultad de establecer el diagnóstico preciso de la esquizofrenia, que en la actualidad aún está basado en los síntomas clínicos (van Os & Kapur, 2009) por no existir pruebas diagnósticas objetivas validadas para establecer los fenotipos precisos de la enfermedad (Allen et al., 2009). Esto plantea una serie de problemas, como la variación de los síntomas de unos pacientes a otros e incluso en el mismo paciente con el tiempo (van Os & Kapur, 2009), por lo que los fenotipos derivados del diagnóstico clínico de la esquizofrenia pueden ser heterogéneos entre sí y en consecuencia, que este fenotipo diagnóstico no sea apto para la estratificación de los pacientes en la búsqueda de factores de riesgo genético.

A pesar de que los resultados encontrados apoyan la implicación de las citoquinas en el desarrollo de la esquizofrenia, probablemente a través de la alteración del neurodesarrollo normal durante la fase prenatal, el papel del sistema inmune como factor de riesgo en esquizofrenia aún debe ser esclarecido, ya que diversos componentes del mismo han sido asociados a esta enfermedad (Stefansson et al., 2009) (Potvin et al., 2008).

Estudios de asociación basados en SNPs en genes que participen en vías biológicas previsiblemente implicadas en la esquizofrenia, en vez de en genes candidatos o estudios de todo el genoma, serían más apropiados dada la naturaleza poligénica de la esquizofrenia en la que múltiples vías biológicas pueden encontrarse alteradas.

Además, a esto hay que añadir que la investigación de factores genéticos en la esquizofrenia se vería facilitada si se realizara en los denominados endofenotipos, fenotipos intermedios que co-segregan con la esquizofrenia, que están presentes independientemente del estado de la enfermedad y que además se encuentran en familiares no afectados de pacientes esquizofrénicos (Gottesman & Gould, 2003). Estos fenotipos estarían más ligados a procesos biológicos potencialmente alterados en la esquizofrenia y por tanto más cercanos a las alteraciones genéticas que el fenotipo diagnóstico de la enfermedad, que plantea los problemas ya citados con anterioridad.

En definitiva, el uso de endofenotipos donde estudiar factores genéticos en vías biológicas candidatas a estar alteradas, conseguiría reducir la heterogeneidad genética propia de la esquizofrenia y por tanto aumentar el poder estadístico de los estudios.



*Conclusiones*

1. Este estudio demuestra que *PHARMAChip*® es una herramienta adecuada desde el punto de vista analítico para el genotipado farmacogenético. Desde el punto de vista clínico, un diseño más específico en cuanto al mecanismo de acción de un fármaco o grupo terapéutico, que incluya exclusivamente variantes genéticas de demostrada utilidad en la predicción de la respuesta terapéutica, favorecerá la implementación de esta herramienta en la práctica clínica.

2. Las diferencias encontradas en *ADRB2*, *CYP1A2*, *CYP2D6*, *GSTP1*, *IL-10*, *MDR1*, *NAT2*, *UGT1A1* y *TNF $\alpha$*  en la población estudiada respecto de otros controles en población caucásica hacen que sea necesario el establecimiento de la distribución alélica, genotípica y fenotípica de las variantes con utilidad en farmacogenética en cada población para evitar sesgos de selección en los estudios farmacogenéticos y de asociación.

3. En relación con la respuesta a risperidona, variantes funcionales en los genes *ADRB2*, *CYP2D6*, *DRD2*, *DRD3*, *GRIN2B*, *HTR2A*, *MDR1* y *SLC6A4* se asocian a una diferente susceptibilidad de los pacientes estudiados al desarrollo de efectos adversos. Además el fenotipo metabolizador lento de *CYP2D6* y el alelo 3435T de *MDR1*, ambos implicados en la farmacocinética de risperidona, se asocian a una mejor respuesta en términos de cambio en la escala total de PANSS.

4. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la naturaleza poligénica de la respuesta a risperidona, con participación de genes pertenecientes a vías biológicas implicadas en el mecanismo de acción de este fármaco y otras relacionadas. Además, pone en evidencia la heterogeneidad genética y clínica existentes en el fenotipo respuesta.

5. El bajo tamaño muestral y la heterogeneidad de los pacientes en relación con el diagnóstico, tratamiento y variables de confusión demográficas y clínicas propios de este estudio pueden ser una posible causa de la falta de replicación de las variantes genéticas previamente descritas asociadas a respuesta y efectos adversos, tales como síntomas extrapiramidales o aumento de peso, y la falta de asociación con la respuesta a risperidona de variantes genéticas en *ADRB1*, *BDNF*, *COMT*, *CYP3A4*, *HTR1A*, *HTR2C* y *HTR6*.

6. El genotipo ATA/ATA es un factor de riesgo de esquizofrenia en mujeres españolas, lo que apoya el papel de la desregulación del balance en la señalización pro y antiinflamatoria en la etiología de la enfermedad.

7. La presencia del genotipo ATA/ATA como factor de riesgo de esquizofrenia exclusivamente en mujeres apoya la diferente presentación, previamente descrita, de la enfermedad en base al sexo, en relación con su incidencia, desarrollo, anormalidades cerebrales o respuesta al tratamiento.

8. La falta de replicación de las asociaciones descritas en los genes *COMT*, *CYP1A2*, *CYP2D6*, *DRD3*, *GRIN2B*, *GSTM1*, *GSTT1*, *HTR2A*, *MTHFR*, *SLC6A4*, *TNF $\alpha$*  con la esquizofrenia puede ser debida al limitado tamaño muestral estudiado, a la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad y a la heterogeneidad genética existente en la esquizofrenia.

## *Bibliografia*



- Abdolmaleky, H. M., Faraone, S. V., Glatt, S. J., & Tsuang, M. T. (2004). Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res*, 67(1), 53-62.
- Agundez, J. A., Olivera, M., Martinez, C., Ladero, J. M., & Benitez, J. (1996). Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics*, 6(5), 423-428.
- Al Hadithy, A. F., Ivanova, S. A., Pechlivanoglou, P., Semke, A., Fedorenko, O., Kornetova, E. et al. (2009). Tardive dyskinesia and DRD3, HTR2A and HTR2C gene polymorphisms in Russian psychiatric inpatients from Siberia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(3), 475-481.
- Allabi, A. C., Gala, J. L., Desager, J. P., Heusterspreute, M., & Horsmans, Y. (2003). Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol*, 56(6), 653-657.
- Allen, A. J., Griss, M. E., Folley, B. S., Hawkins, K. A., & Pearlson, G. D. (2009). Endophenotypes in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res*, 109(1-3), 24-37.
- Allen, N. C., Bagade, S., McQueen, M. B., Ioannidis, J. P., Kavvoura, F. K., Khoury, M. J. et al. (2008). Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*, 40(7), 827-834.
- Ameyaw, M. M., Collie-Duguid, E. S., Powrie, R. H., Ofori-Adjei, D., & McLeod, H. L. (1999). Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet*, 8(2), 367-370.
- Anderson, G. M., Scahill, L., McCracken, J. T., McDougle, C. J., Aman, M. G., Tierney, E. et al. (2007). Effects of short- and long-term risperidone treatment on prolactin levels in children with autism. *Biological psychiatry*, 61(4), 545-550.
- Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H. et al. (2000). Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer research*, 60(24), 6921-6926.
- Arranz, M. J., & Kapur, S. (2008). Pharmacogenetics in psychiatry: are we ready for widespread clinical use? *Schizophr Bull*, 34(6), 1130-1144.
- Basile, V. S., Masellis, M., Potkin, S. G., & Kennedy, J. L. (2002). Pharmacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy. *Hum Mol Genet*, 11(20), 2517-2530.
- Benmessaoud, D., Hamdani, N., Boni, C., Ramoz, N., Hamon, M., Kacha, F. et al. (2008). Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT2A receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics. *BMC Psychiatry*, 8, 40.
- Bertolino, A., & Blasi, G. (2009). The genetics of schizophrenia. *Neuroscience*, 164(1), 288-299.

- Bhasker, C. R., & Hardiman, G. (2010). Advances in pharmacogenomics technologies. *Pharmacogenomics*, 11(4), 481-485.
- Bishop, J. R., Ellingrod, V. L., Akroush, M., & Moline, J. (2009). The association of serotonin transporter genotypes and selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)-associated sexual side effects: possible relationship to oral contraceptives. *Hum Psychopharmacol*, 24(3), 207-215.
- Bobes, J., Garc, A. P. M. P., Rejas, J., Hern Ndez, G., Garcia-Garcia, M., Rico-Villademoros, F. et al. (2003). Frequency of sexual dysfunction and other reproductive side-effects in patients with schizophrenia treated with risperidone, olanzapine, quetiapine, or haloperidol: the results of the EIRE study. *J Sex Marital Ther*, 29(2), 125-147.
- Bocchio Chiavetto, L., Boin, F., Zanardini, R., Popoli, M., Michelato, A., Bignotti, S. et al. (2002). Association between promoter polymorphic haplotypes of interleukin-10 gene and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 51(6), 480-484.
- Boulton, D. W., DeVane, C. L., Liston, H. L., & Markowitz, J. S. (2002). In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci*, 71(2), 163-169.
- Brown, A. S. (2006). Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull*, 32(2), 200-202.
- Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M. et al. (2004). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 61(8), 774-780.
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*, 167(3), 261-280.
- Brown, A. S., & Susser, E. S. (2008). Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull*, 34(6), 1054-1063.
- Burmeister, M., McInnis, M. G., & Zollner, S. (2008). Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet*, 9(7), 527-540.
- Bushe, C., & Shaw, M. (2007). Prevalence of hyperprolactinaemia in a naturalistic cohort of schizophrenia and bipolar outpatients during treatment with typical and atypical antipsychotics. *J Psychopharmacol*, 21(7), 768-773.
- Calarge, C. A., Ellingrod, V. L., Acion, L., Miller, D. D., Moline, J., Tansey, M. J. et al. (2009a). Variants of the dopamine D2 receptor gene and risperidone-induced hyperprolactinemia in children and adolescents. *Pharmacogenet Genomics*, 19(5), 373-382.
- Calarge, C. A., Ellingrod, V. L., Zimmerman, B., Acion, L., Sivitz, W. I., & Schlechte, J. A. (2009b). Leptin gene -2548G/A variants predict risperidone-associated weight gain in children and adolescents. *Psychiatr Genet*, 19(6), 320-327.
- Caldwell, C. B., & Gottesman, I. I. (1990). Schizophrenics kill themselves too: a review of risk factors for suicide. *Schizophr Bull*, 16(4), 571-589.

- Cannon, M., Jones, P. B., & Murray, R. M. (2002). Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*, 159(7), 1080-1092.
- Cantor-Graae, E., & Selten, J. P. (2005). Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry*, 162(1), 12-24.
- Carlsson, A. (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1(3), 179-186.
- Carrasco-Garrido, P., de Andres, L. A., Barrera, V. H., de Miguel, G. A., & Jimenez-Garcia, R. (2010). Trends of adverse drug reactions related-hospitalizations in Spain (2001-2006). *BMC Health Serv Res*, 10, 287.
- Chen, S., Chou, W. H., Blouin, R. A., Mao, Z., Humphries, L. L., Meek, Q. C. et al. (1996). The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther*, 60(5), 522-534.
- Chen, W., Duan, S., Zhou, J., Sun, Y., Zheng, Y., Gu, N. et al. (2004). A case-control study provides evidence of association for a functional polymorphism -197C/G in XBP1 to schizophrenia and suggests a sex-dependent effect. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(3), 866-870.
- Cherlyn, S. Y., Woon, P. S., Liu, J. J., Ong, W. Y., Tsai, G. C., & Sim, K. (2010). Genetic association studies of glutamate, GABA and related genes in schizophrenia and bipolar disorder: a decade of advance. *Neurosci Biobehav Rev*, 34(6), 958-977.
- Clark, D., Skrobot, O. A., Adebiyi, I., Susce, M. T., de Leon, J., Blakemore, A. F. et al. (2009). Apolipoprotein-E gene variants associated with cardiovascular risk factors in antipsychotic recipients. *Eur Psychiatry*, 24(7), 456-463.
- Corominas, H., Domenech, M., del Rio, E., Gich, I., Domingo, P., & Baiget, M. (2006). [Frequency of thiopurine S-methyltransferase alleles in different ethnic groups living in Spain]. *Medicina clinica*, 126(11), 410-412.
- Correia, C. T., Almeida, J. P., Santos, P. E., Sequeira, A. F., Marques, C. E., Miguel, T. S. et al. (2010). Pharmacogenetics of risperidone therapy in autism: association analysis of eight candidate genes with drug efficacy and adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J*, 10(5), 418-430.
- Creese, I., Burt, D. R., & Snyder, S. H. (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192(4238), 481-483.
- Cuyas, E., Olano-Martin, E., Khymenets, O., Hernandez, L., Jofre-Monseny, L., Grandoso, L. et al. (2010). Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMAchip. *Pharmacogenomics*, 11(2), 257-266.
- Czerski, P. M., Rybakowski, F., Kapelski, P., Rybakowski, J. K., Dmitrzak-Weglarz, M., Leszczynska-Rodziewicz, A. et al. (2008). Association of tumor necrosis

factor -308G/A promoter polymorphism with schizophrenia and bipolar affective disorder in a Polish population. *Neuropsychobiology*, 57(1-2), 88-94.

- D'Souza, D. C., Sewell, R. A., & Ranganathan, M. (2009). Cannabis and psychosis/schizophrenia: human studies. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 259(7), 413-431.
- Dale, M. (2000). Sistema nervioso central: Otros neurotransmisores y neuromoduladores: Dopamina. (4<sup>a</sup> ed.). Barcelona: Harcourt.
- Daly, A. K. (2010). Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nat Rev Genet*, 11(4), 241-246.
- Dawson, E., Powell, J. F., Nothen, M. M., Crocq, M. A., Lanczik, M., Korner, J. et al. (1994). An association study of debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) polymorphisms in schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 4(4), 215-218.
- de Leon, J., Sandson, N. B., & Cozza, K. L. (2008). A preliminary attempt to personalize risperidone dosing using drug-drug interactions and genetics: part I. *Psychosomatics*, 49(3), 258-270.
- de Leon, J., Susce, M. T., Pan, R. M., Fairchild, M., Koch, W. H., & Wedlund, P. J. (2005). The CYP2D6 poor metabolizer phenotype may be associated with risperidone adverse drug reactions and discontinuation. *J Clin Psychiatry*, 66(1), 15-27.
- de Leon, J., Wynn, G., & Sandson, N. B. (2010). The pharmacokinetics of paliperidone versus risperidone. *Psychosomatics*, 51(1), 80-88.
- De Roos, A. J., Rothman, N., Brown, M., Bell, D. A., Pittman, G. S., Shapiro, W. R. et al. (2006). Variation in genes relevant to aromatic hydrocarbon metabolism and the risk of adult brain tumors. *Neuro Oncol*, 8(2), 145-155.
- Dolzan, V., Serretti, A., Mandelli, L., Koprivsek, J., Kastelic, M., & Plesnicar, B. K. (2008). Acute antipsychotic efficacy and side effects in schizophrenia: association with serotonin transporter promoter genotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(6), 1562-1566.
- Dorado, P., Caceres, M. C., Pozo-Guisado, E., Wong, M. L., Licinio, J., & Llerena, A. (2005). Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques*, 39(4), 571-574.
- Dossenbach, M., Hodge, A., Anders, M., Molnar, B., Pecukaitiene, D., Krupka-Matuszczyk, I. et al. (2005). Prevalence of sexual dysfunction in patients with schizophrenia: international variation and underestimation. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8(2), 195-201.
- Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Altshuler, D. L., Auton, A., Brooks, L. D., Gibbs, R. A. et al. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061-1073.

- Dutheil, F., Beaune, P., & Lorient, M. A. (2008). Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*, 90(3), 426-436.
- Edwards-Smith, C. J., Jonsson, J. R., Purdie, D. M., Bansal, A., Shorthouse, C., & Powell, E. E. (1999). Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*, 30(2), 526-530.
- Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M., & Evans, W. E. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, 57, 119-137.
- Ellsworth, D. L., Coady, S. A., Chen, W., Srinivasan, S. R., Elkasabany, A., Gustat, J. et al. (2002). Influence of the beta2-adrenergic receptor Arg16Gly polymorphism on longitudinal changes in obesity from childhood through young adulthood in a biracial cohort: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(7), 928-937.
- Fatini, C., Sticchi, E., Sofi, F., Said, A. A., Pratesi, G., Pulli, R. et al. (2009). Multilocus analysis in candidate genes ACE, AGT, and AGTR1 and predisposition to peripheral arterial disease: role of ACE D/-240T haplotype. *J Vasc Surg*, 50(6), 1399-1404.
- Feuk, L., Carson, A. R., & Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7(2), 85-97.
- Fijal, B. A., Kinon, B. J., Kapur, S., Stauffer, V. L., Conley, R. R., Jamal, H. H. et al. (2009). Candidate-gene association analysis of response to risperidone in African-American and white patients with schizophrenia. *Pharmacogenomics J*, 9(5), 311-318.
- Fleeman, N., McLeod, C., Bagust, A., Beale, S., Boland, A., Dundar, Y. et al. (2010). The clinical effectiveness and cost-effectiveness of testing for cytochrome P450 polymorphisms in patients with schizophrenia treated with antipsychotics: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, 14(3), 1-157, iii.
- Fleischhacker, W. W., Keet, I. P., & Kahn, R. S. (2005). The European First Episode Schizophrenia Trial (EUFEST): rationale and design of the trial. *Schizophr Res*, 78(2-3), 147-156.
- Flores, C., Maca-Meyer, N., Gonzalez, A. M., Oefner, P. J., Shen, P., Perez, J. A. et al. (2004). Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur J Hum Genet*, 12(10), 855-863.
- Flórez, J., Armijo, J. A., & Mediavilla, A. (2003). *Farmacología Humana* (4ª ed.). Masson.
- Freedman, R. (2003). Schizophrenia. *N Engl J Med*, 349(18), 1738-1749.
- Frueh, F. W., Amur, S., Mummaneni, P., Epstein, R. S., Aubert, R. E., DeLuca, T. M. et al. (2008). Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by

the United States food and drug administration: prevalence of related drug use. *Pharmacotherapy*, 28(8), 992-998.

- Gaedigk, A., Simon, S. D., Pearce, R. E., Bradford, L. D., Kennedy, M. J., & Leeder, J. S. (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*, 83(2), 234-242.
- Garcia-Closas, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D. W. et al. (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 366(9486), 649-659.
- Garcia-Martin, E. (2008). Interethnic and intraethnic variability of NAT2 single nucleotide polymorphisms. *Curr Drug Metab*, 9(6), 487-497.
- Gardner, D. M., Baldessarini, R. J., & Waraich, P. (2005). Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ*, 172(13), 1703-1711.
- Gasso, P., Mas, S., Alvarez, S., Trias, G., Bioque, M., Oliveira, C. et al. (2010a). Xenobiotic metabolizing and transporter genes: gene-gene interactions in schizophrenia and related disorders. *Pharmacogenomics*, 11(12), 1725-1731.
- Gasso, P., Mas, S., Bernardo, M., Alvarez, S., Parellada, E., & Lafuente, A. (2009). A common variant in DRD3 gene is associated with risperidone-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics J*, 9(6), 404-410.
- Gasso, P., Mas, S., Oliveira, C., Bioque, M., Parellada, E., Bernardo, M. et al. (2010b). Searching for functional SNPs or rare variants in exonic regions of DRD3 in risperidone-treated patients. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Gelernter, J., Kranzler, H., & Cubells, J. F. (1997). Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet*, 101(2), 243-246.
- Gervasini, G., Benitez, J., & Carrillo, J. A. (2010). Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. *Eur J Clin Pharmacol*, 66(8), 755-774.
- Gervasini, G., Garcia-Martin, E., Ladero, J. M., Pizarro, R., Sastre, J., Martinez, C. et al. (2007). Genetic variability in CYP3A4 and CYP3A5 in primary liver, gastric and colorectal cancer patients. *BMC Cancer*, 7, 118.
- Ghaeli, P., & Dufresne, R. L. (1996). Serum triglyceride levels in patients treated with clozapine. *Am J Health Syst Pharm*, 53(17), 2079-2081.
- Gilmore, J. H., & Jarskog, L. F. (1997). Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia. *Schizophr Res*, 24(3), 365-367.
- Gomez, R., Romero, R., Ghezzi, F., Yoon, B. H., Mazor, M., & Berry, S. M. (1988). The fetal inflammatory response syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 179(1), 194-202.

- Gottesman, I. I., & Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 160(4), 636-645.
- Gravina, P., Spoletini, I., Masini, S., Valentini, A., Vanni, D., Paladini, E. et al. (2010). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1, GSTP1 and GSTA1 as risk factors for schizophrenia. *Psychiatry Res.*
- Greenbaum, L., Smith, R. C., Rigbi, A., Strous, R., Teltsh, O., Kanyas, K. et al. (2009). Further evidence for association of the RGS2 gene with antipsychotic-induced parkinsonism: protective role of a functional polymorphism in the 3'-untranslated region. *Pharmacogenomics J*, 9(2), 103-110.
- Guillemette, C., De Vivo, I., Hankinson, S. E., Haiman, C. A., Spiegelman, D., Housman, D. E. et al. (2001). Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(6), 711-714.
- Guillin, O., Abi-Dargham, A., & Laruelle, M. (2007). Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*, 78, 1-39.
- Gunes, A., Scordo, M. G., Jaanson, P., & Dahl, M. L. (2007). Serotonin and dopamine receptor gene polymorphisms and the risk of extrapyramidal side effects in perphenazine-treated schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)*, 190(4), 479-484.
- Gupta, M., Bhatnagar, P., Grover, S., Kaur, H., Baghel, R., Bhasin, Y. et al. (2009). Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics*, 10(3), 385-397.
- Guzey, C., Scordo, M. G., Spina, E., Landsem, V. M., & Spigset, O. (2007). Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol*, 63(3), 233-241.
- Gvilia, I. (2010). Underlying brain mechanisms that regulate sleep-wakefulness cycles. *International review of neurobiology*, 93, 1-21.
- Hagg, S., Joelsson, L., Mjorndal, T., Spigset, O., Oja, G., & Dahlqvist, R. (1998). Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in patients treated with clozapine compared with patients treated with conventional depot neuroleptic medications. *J Clin Psychiatry*, 59(6), 294-299.
- Haramburu, F., Pouyanne, P., Imbs, J. L., Blayac, J. P., & Begaud, B. (2000). [Incidence and prevalence of adverse drug reactions]. *Presse Med*, 29(2), 111-114.
- Hazelwood, L. A., & Sanders-Bush, E. (2004). His452Tyr polymorphism in the human 5-HT<sub>2A</sub> receptor destabilizes the signaling conformation. *Molecular pharmacology*, 66(5), 1293-1300.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D. et al. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*, 66(6), 2621-2624.

- Heim, M., & Meyer, U. A. (1990). Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet*, 336(8714), 529-532.
- Hennah, W., Varilo, T., Kestila, M., Paunio, T., Arajärvi, R., Haukka, J. et al. (2003). Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet*, 12(23), 3151-3159.
- Himeji, A., & Okamura, T. (2005). Evaluation of the clinical efficacy of risperidone for untreated and treated cases of schizophrenia from various aspects. *Psychiatry Clin Neurosci*, 59(5), 556-562.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A. et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3473-3478.
- Holmes, A., Lachowicz, J. E., & Sibley, D. R. (2004). Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 47(8), 1117-1134.
- Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*, 18(2), 83-88.
- Hosford, D. A., Lai, E. H., Riley, J. H., Xu, C. F., Danoff, T. M., & Roses, A. D. (2004). Pharmacogenetics to predict drug-related adverse events. *Toxicol Pathol*, 32 Suppl 1, 9-12.
- Hubner, R. A., Liu, J. F., Sellick, G. S., Logan, R. F., Houlston, R. S., & Muir, K. R. (2007). Thymidylate synthase polymorphisms, folate and B-vitamin intake, and risk of colorectal adenoma. *Br J Cancer*, 97(10), 1449-1456.
- National Human Genome Research Institute-[www.genome.gov](http://www.genome.gov)
- Hurtado, F., Escrivá, P., Catalán, A., & Mir, J. (2002). Vademecum Sexual: Fármacos y disfunción sexual. *Cuadernos de Medicina Psicosomática y Psiquiatría de Enlace*, 62/63, 32.
- Hyman, S. E. (2008). A glimmer of light for neuropsychiatric disorders. *Nature*, 455(7215), 890-893.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (2006).
- Ikeda, M., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kitajima, T., Yoshimura, R., Hashimoto, S. et al. (2008). Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia. *Pharmacogenomics*, 9(10), 1437-1443.
- Ingelman-Sundberg, M., & Sim, S. C. (2010). Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1), 90-94.



- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 116(3), 496-526.
- International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968), 789-796.
- Jarskog, L. F., Miyamoto, S., & Lieberman, J. A. (2007). Schizophrenia: new pathological insights and therapies. *Annu Rev Med*, 58, 49-61.
- Jarskog, L. F., Xiao, H., Wilkie, M. B., Lauder, J. M., & Gilmore, J. H. (1997). Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *Int J Dev Neurosci*, 15(6), 711-716.
- Jeanneteau, F., Funalot, B., Jankovic, J., Deng, H., Lagarde, J. P., Lucotte, G. et al. (2006). A functional variant of the dopamine D3 receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28), 10753-10758.
- Jia, P., Sun, J., Guo, A. Y., & Zhao, Z. (2010). SZGR: a comprehensive schizophrenia gene resource. *Mol Psychiatry*, 15(5), 453-462.
- Jia, P., Wang, L., Meltzer, H. Y., & Zhao, Z. (2010). Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. *Schizophr Res*, 122(1-3), 38-42.
- Johnson, J. A. (2003). Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet*, 19(11), 660-666.
- Jonsson, E. G., Dahl, M. L., Roh, H. K., Jerling, M., & Sedvall, G. C. (1998). Lack of association between debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) gene polymorphisms and schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 8(1), 25-28.
- Kakihara, S., Yoshimura, R., Shinkai, K., Matsumoto, C., Goto, M., Kaji, K. et al. (2005). Prediction of response to risperidone treatment with respect to plasma concentrations of risperidone, catecholamine metabolites, and polymorphism of cytochrome P450 2D6. *Int Clin Psychopharmacol*, 20(2), 71-78.
- Kang, C. Y., Xu, X. F., Shi, Z. Y., Yang, J. Z., Liu, H., & Xu, H. H. (2010). Interaction of catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158 Met genotype and risperidone treatment in Chinese Han patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*, 176(1), 94-95.
- Kapur, S., & Remington, G. (2001). Atypical antipsychotics: new directions and new challenges in the treatment of schizophrenia. *Annu Rev Med*, 52, 503-517.
- Kapur, S., Roy, P., Daskalakis, J., Remington, G., & Zipursky, R. (2001). Increased dopamine d(2) receptor occupancy and elevated prolactin level associated with addition of haloperidol to clozapine. *Am J Psychiatry*, 158(2), 311-314.

- Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., Remington, G., & Houle, S. (2000). Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(4), 514-520.
- Kay, S. R., Fiszbein, A., & Opler, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*, 13(2), 261-276.
- Kim, B., Choi, E. Y., Kim, C. Y., Song, K., & Joo, Y. H. (2008). Could HTR2A T102C and DRD3 Ser9Gly predict clinical improvement in patients with acutely exacerbated schizophrenia? Results from treatment responses to risperidone in a naturalistic setting. *Hum Psychopharmacol*, 23(1), 61-67.
- Kirov, G., O'Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2005). Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest*, 115(6), 1440-1448.
- Kohlrausch, F. B., Gama, C. S., Lobato, M. I., Belmonte-de-Abreu, P., Gesteira, A., Barros, F. et al. (2009). Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics*, 10(9), 1457-1466.
- Konneker, T. I., Crowley, J. J., Quackenbush, C. R., Keefe, R. S., Perkins, D. O., Stroup, T. S. et al. (2010). No association of the serotonin transporter polymorphisms 5-HTTLPR and RS25531 with schizophrenia or neurocognition. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(5), 1115-1117.
- Krabbedam, L., & van Os, J. (2005). Schizophrenia and urbanicity: a major environmental influence--conditional on genetic risk. *Schizophr Bull*, 31(4), 795-799.
- Kronfol, Z., & Remick, D. G. (2000). Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 157(5), 683-694.
- Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D. et al. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 51(3), 199-214.
- Kuzman, M. R., Medved, V., Bozina, N., Hotujac, L., Sain, I., & Bilusic, H. (2008). The influence of 5-HT(2C) and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients. *Psychiatry Res*, 160(3), 308-315.
- Lambert, M., Conus, P., Eide, P., Mass, R., Karow, A., Moritz, S. et al. (2004). Impact of present and past antipsychotic side effects on attitude toward typical antipsychotic treatment and adherence. *Eur Psychiatry*, 19(7), 415-422.
- Lane, H. Y., Chang, Y. C., Chiu, C. C., Chen, M. L., Hsieh, M. H., & Chang, W. H. (2002). Association of risperidone treatment response with a polymorphism in the 5-HT(2A) receptor gene. *Am J Psychiatry*, 159(9), 1593-1595.
- Lane, H. Y., Hsu, S. K., Liu, Y. C., Chang, Y. C., Huang, C. H., & Chang, W. H. (2005). Dopamine D3 receptor Ser9Gly polymorphism and risperidone response. *J Clin Psychopharmacol*, 25(1), 6-11.

- Lane, H. Y., Lee, C. C., Chang, Y. C., Lu, C. T., Huang, C. H., & Chang, W. H. (2004a). Effects of dopamine D2 receptor Ser311Cys polymorphism and clinical factors on risperidone efficacy for positive and negative symptoms and social function. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7(4), 461-470.
- Lane, H. Y., Lin, C. C., Huang, C. H., Chang, Y. C., Hsu, S. K., & Chang, W. H. (2004b). Risperidone response and 5-HT<sub>6</sub> receptor gene variance: genetic association analysis with adjustment for nongenetic confounders. *Schizophr Res*, 67(1), 63-70.
- Lane, H. Y., Liu, Y. C., Huang, C. L., Chang, Y. C., Wu, P. L., Lu, C. T. et al. (2006). Risperidone-related weight gain: genetic and nongenetic predictors. *J Clin Psychopharmacol*, 26(2), 128-134.
- Lang, U. E., Puls, I., Muller, D. J., Strutz-Seeböhm, N., & Gallinat, J. (2007). Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem*, 20(6), 687-702.
- Lazarou, J., Pomeranz, B. H., & Corey, P. N. (1998). Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279(15), 1200-1205.
- Lencz, T., Robinson, D. G., Xu, K., Ekholm, J., Sevy, S., Gunduz-Bruce, H. et al. (2006). DRD2 promoter region variation as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first-episode schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 163(3), 529-531.
- Lerich, L., Diaz, J., & Sokoloff, P. (2004). Dopamine and glutamate dysfunctions in schizophrenia: role of the dopamine D3 receptor. *Neurotox Res*, 6(1), 63-71.
- Leung, A., & Chue, P. (2000). Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 401, 3-38.
- Lieberman, J. A., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O. et al. (2005). Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med*, 353(12), 1209-1223.
- Liebler, D. C., & Guengerich, F. P. (2005). Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nat Rev Drug Discov*, 4(5), 410-420.
- Lingjaerde, O., Ahlfors, U. G., Bech, P., Dencker, S. J., & Elgen, K. (1987). The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 334, 1-100.
- Liou, Y. J., Wang, Y. C., Chen, J. Y., Bai, Y. M., Lin, C. C., Liao, D. L. et al. (2007). Association analysis of polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2B (GRIN2B) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 153(3), 271-275.
- Liu-Seifert, H., Kinon, B. J., Tennant, C. J., Sniadecki, J., & Volavka, J. (2009). Sexual dysfunction in patients with schizophrenia treated with conventional antipsychotics or risperidone. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 5, 47-54.

- Liu, B. C., Zhang, J., Wang, L., Li, X. W., Wang, Y., Wei, Z. Y. et al. (2010). HTR2C promoter polymorphisms are associated with risperidone efficacy in Chinese female patients. *Pharmacogenomics*, 11(5), 685-692.
- Llerena, A., Dorado, P., Penas-Lledo, E. M., Caceres, M. C., & De la Rubia, A. (2007). Low frequency of CYP2D6 poor metabolizers among schizophrenia patients. *Pharmacogenomics J*, 7(6), 408-410.
- López-Rodríguez, R. (2010) *Implicación de los polimorfismos genéticos en la farmacocinética y farmacodinamia de antipsicóticos: estudio farmacogenético en voluntarios sanos*. Tesis Doctoral
- Lovlie, R., Daly, A. K., Molven, A., Idle, J. R., & Steen, V. M. (1996). Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*, 392(1), 30-34.
- Lundstrom, K., & Turpin, M. P. (1996). Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun*, 225(3), 1068-1072.
- Luo, H. R., Poland, R. E., Lin, K. M., & Wan, Y. J. (2006). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. *Clin Pharmacol Ther*, 80(1), 33-40.
- Maki, P., Veijola, J., Jones, P. B., Murray, G. K., Koponen, H., Tienari, P. et al. (2005). Predictors of schizophrenia--a review. *Br Med Bull*, 73-74, 1-15.
- Martinez, C., Garcia-Martin, E., Blanco, G., Gamito, F. J., Ladero, J. M., & Agundez, J. A. (2005). The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 59(1), 62-69.
- Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Hashimoto, T., Shimizu, E., Watanabe, H., Fujita, Y. et al. (2009). Association study between the genetic polymorphisms of glutathione-related enzymes and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(1), 86-94.
- McCarley, R. W. (1982). REM sleep and depression: common neurobiological control mechanisms. *The American journal of psychiatry*, 139(5), 565-570.
- McGrath, J., Saha, S., Welham, J., El Saadi, O., MacCauley, C., & Chant, D. (2004). A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med*, 2, 13.
- MedDRA Frequency Convention
- Menoyo, A., del Rio, E., & Baiget, M. (2006). Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*, 24(5), 381-385.

- Meyer, U., Feldon, J., & Yee, B. K. (2009). A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 35(5), 959-972.
- Meyer, U. A. (2004). Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*, 5(9), 669-676.
- Mishra, D. K., Kumar, A., Srivastava, D. S., & Mittal, R. D. (2004). Allelic variation of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes in North Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 5(4), 362-365.
- Mitchell, N. D., & Baker, G. B. (2010). An update on the role of glutamate in the pathophysiology of depression. *Acta Psychiatr Scand*, 122(3), 192-210.
- Miyamoto, S., LaMantia, A. S., Duncan, G. E., Sullivan, P., Gilmore, J. H., & Lieberman, J. A. (2003). Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*, 3(1), 27-39.
- Mizutani, T. (2003). PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev*, 35(2-3), 99-106.
- Moore, T. H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T. R., Jones, P. B., Burke, M. et al. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*, 370(9584), 319-328.
- Morgan, C., Kirkbride, J., Hutchinson, G., Craig, T., Morgan, K., Dazzan, P. et al. (2008). Cumulative social disadvantage, ethnicity and first-episode psychosis: a case-control study. *Psychol Med*, 38(12), 1701-1715.
- Mossner, R., Daniel, S., Albert, D., Heils, A., Okladnova, O., Schmitt, A. et al. (2000). Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve growth factor (NGF). *Neurochem Int*, 36(3), 197-202.
- Mossner, R., Schuhmacher, A., Kuhn, K. U., Cvetanovska, G., Rujescu, D., Zill, P. et al. (2009). Functional serotonin 1A receptor variant influences treatment response to atypical antipsychotics in schizophrenia. *Pharmacogenet Genomics*, 19(1), 91-94.
- Mousa, A., Seiger, A., Kjaeldgaard, A., & Bakhiet, M. (1999). Human first trimester forebrain cells express genes for inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 11(1), 55-60.
- Mulder, H., Cohen, D., Scheffer, H., Gispen-de Wied, C., Arends, J., Wilmink, F. W. et al. (2009). HTR2C gene polymorphisms and the metabolic syndrome in patients with schizophrenia: a replication study. *J Clin Psychopharmacol*, 29(1), 16-20.
- Mulder, H., Franke, B., van der-Beek van der, A. A., Arends, J., Wilmink, F. W., Scheffer, H. et al. (2007). The association between HTR2C gene polymorphisms and the metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*, 27(4), 338-343.
- Neville, M. J., Johnstone, E. C., & Walton, R. T. (2004). Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat*, 23(6), 540-545.

- Nnadi, C. U., & Malhotra, A. K. (2007). Individualizing antipsychotic drug therapy in schizophrenia: the promise of pharmacogenetics. *Curr Psychiatry Rep*, 9(4), 313-318.
- Novalbos, J., Lopez-Rodriguez, R., Roman, M., Gallego-Sandin, S., Ochoa, D., & Abad-Santos, F. (2010). Effects of CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of risperidone in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol*, 30(5), 504-511.
- Nunokawa, A., Watanabe, Y., Kaneko, N., Sugai, T., Yazaki, S., Arinami, T. et al. (2010). The dopamine D3 receptor (DRD3) gene and risk of schizophrenia: case-control studies and an updated meta-analysis. *Schizophr Res*, 116(1), 61-67.
- Nussbaum, M. D., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2007). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (Seventh Edition ed.). Saunders Elsevier.
- Ohtsuki, T., Sakurai, K., Dou, H., Toru, M., Yamakawa-Kobayashi, K., & Arinami, T. (2001). Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 6(2), 211-216.
- OMS, Nations for Mental Health (1998). *Schizophrenia and Public Health*
- OMS (2001). *The World Health Report 2001. Mental Health: New Understanding, New Hope.*
- Ortiz, J., Fernandez-Arquero, M., Urcelay, E., Lopez-Mejias, R., Ferreira, A., Fontan, G. et al. (2006). Interleukin-10 polymorphisms in Spanish IgA deficiency patients: a case-control and family study. *BMC Med Genet*, 7, 56.
- Ostrer, H. (2001). Invited review: sex-based differences in gene expression. *J Appl Physiol*, 91(5), 2384-2388.
- Ozdemir, V., Gunes, A., Dahl, M. L., Scordo, M. G., Williams-Jones, B., & Someya, T. (2006). Could endogenous substrates of drug-metabolizing enzymes influence constitutive physiology and drug target responsiveness? *Pharmacogenomics*, 7(8), 1199-1210.
- Paez, D., Pare, L., Altes, A., Sancho-Poch, F. J., Petriz, L., Garriga, J. et al. (2010). Thymidylate synthase germline polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on 5-fluorouracil. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(11), 1681-1689.
- Paul-Samojedny, M., Kowalczyk, M., Suchanek, R., Owczarek, A., Fila-Danilow, A., Szczygiel, A. et al. (2010). Functional polymorphism in the interleukin-6 and interleukin-10 genes in patients with paranoid schizophrenia--a case-control study. *J Mol Neurosci*, 42(1), 112-119.
- Peerbooms, O. L., van Os, J., Drukker, M., Kenis, G., Hoogveld, L., de Hert, M. et al. (2010). Meta-analysis of MTHFR gene variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: Evidence for a common genetic vulnerability? *Brain, behavior, and immunity*.

- Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E., Bolt, H. M. et al. (1994). Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, 300(Pt 1), 271-276.
- Peralta Martin, V., & Cuesta Zorita, M. J. (1994). [Validation of positive and negative symptom scale (PANSS) in a sample of Spanish schizophrenic patients]. *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines*, 22(4), 171-177.
- Plesnicar, B. K., Zalar, B., Breskvar, K., & Dolzan, V. (2006). The influence of the CYP2D6 polymorphism on psychopathological and extrapyramidal symptoms in the patients on long-term antipsychotic treatment. *J Psychopharmacol*, 20(6), 829-833.
- Polesskaya, O. O., & Sokolov, B. P. (2002). Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J Neurosci Res*, 67(6), 812-822.
- Potvin, S., Stip, E., Sepehry, A. A., Gendron, A., Bah, R., & Kouassi, E. (2008). Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*, 63(8), 801-808.
- Puche Cañas, E., & de Luna J, D. (2006). [Adverse drug reactions: an update review of the problem in Spain]. *Rev Clin Esp*, 206(7), 336-339.
- Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F. et al. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 460(7256), 748-752.
- Qin, S., Zhao, X., Pan, Y., Liu, J., Feng, G., Fu, J. et al. (2005). An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *European journal of human genetics : EJHG*, 13(7), 807-814.
- Radomsky, E. D., Haas, G. L., Mann, J. J., & Sweeney, J. A. (1999). Suicidal behavior in patients with schizophrenia and other psychotic disorders. *Am J Psychiatry*, 156(10), 1590-1595.
- Redlich, G., Zanger, U. M., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A. B., Eisenacher, M. et al. (2008). Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry. *J Proteome Res*, 7(11), 4678-4688.
- Reist, C., Mintz, J., Albers, L. J., Jamal, M. M., Szabo, S., & Ozdemir, V. (2007). Second-generation antipsychotic exposure and metabolic-related disorders in patients with schizophrenia: an observational pharmacoepidemiology study from 1988 to 2002. *J Clin Psychopharmacol*, 27(1), 46-51.
- Reynolds, G. P., Yao, Z., Zhang, X., Sun, J., & Zhang, Z. (2005). Pharmacogenetics of treatment in first-episode schizophrenia: D3 and 5-HT<sub>2C</sub> receptor polymorphisms separately associate with positive and negative symptom response. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15(2), 143-151.

- Ribases, M., Gratacos, M., Fernandez-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M. et al. (2004). Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet*, 13(12), 1205-1212.
- Riedel, M., Schwarz, M. J., Strassnig, M., Spellmann, I., Muller-Arends, A., Weber, K. et al. (2005). Risperidone plasma levels, clinical response and side-effects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 255(4), 261-268.
- Risperidona comprimidos recubiertos con película*. Fichas técnicas. Agencia Española del Medicamento. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Rodriguez-Santiago, B., Brunet, A., Sobrino, B., Serra-Juhe, C., Flores, R., Armengol, L. et al. (2010). Association of common copy number variants at the glutathione S-transferase genes and rare novel genomic changes with schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 15(10), 1023-1033.
- Roses, A. D. (2004). Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nat Rev Genet*, 5(9), 645-656.
- Ruaño, G., Goethe, J. W., Caley, C., Woolley, S., Holford, T. R., Kocherla, M. et al. (2007). Physiogenomic comparison of weight profiles of olanzapine- and risperidone-treated patients. *Mol Psychiatry*, 12(5), 474-482.
- Ryu, S., Cho, E. Y., Park, T., Oh, S., Jang, W. S., Kim, S. K. et al. (2007). -759 C/T polymorphism of 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene and early phase weight gain associated with antipsychotic drug treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31(3), 673-677.
- Saadat, M., Mobayen, F., & Farrashbandi, H. (2007). Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1: a candidate genetic modifier of individual susceptibility to schizophrenia. *Psychiatry Res*, 153(1), 87-91.
- Saetre, P., Vares, M., Werge, T., Andreassen, O. A., Arinami, T., Ishiguro, H. et al. (2011). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms and age of onset in schizophrenia: A combined analysis of independent samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.
- Saha, S., Chant, D., & McGrath, J. (2007). A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry*, 64(10), 1123-1131.
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., & McGrath, J. (2005). A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*, 2(5), e141.
- Sanchez-Diz, P., Estany-Gestal, A., Aguirre, C., Blanco, A., Carracedo, A., Ibanez, L. et al. (2009). Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe. *Pharmacogenomics J*, 9(5), 306-310.
- Sanders, A. R., Duan, J., Levinson, D. F., Shi, J., He, D., Hou, C. et al. (2008). No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics. *Am J Psychiatry*, 165(4), 497-506.



- Sawa, A., & Snyder, S. H. (2002). Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*, 296(5568), 692-695.
- Schenkel, S. (2000). Promoting patient safety and preventing medical error in emergency departments. *Acad Emerg Med*, 7(11), 1204-1222.
- Scordo, M. G., Spina, E., Facciola, G., Avenoso, A., Johansson, I., & Dahl, M. L. (1999). Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. *Psychopharmacology (Berl)*, 147(3), 300-305.
- Sebat, J., Levy, D. L., & McCarthy, S. E. (2009). Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet*, 25(12), 528-535.
- Seidegard, J., Vorachek, W. R., Pero, R. W., & Pearson, W. R. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(19), 7293-7297.
- Sharma, S., Stabila, J., Pietras, L., Singh, A. R., McGonnigal, B., Ernerudh, J. et al. (2010). Haplotype-dependent differential activation of the human IL-10 gene promoter in macrophages and trophoblasts: implications for placental IL-10 deficiency and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol*, 64(3), 179-187.
- Sheffield, L. J., & Phillimore, H. E. (2009). Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. *Clin Biochem Rev*, 30(2), 55-65.
- Shen, Q., Li, Z. Q., Sun, Y., Wang, T., Wan, C. L., Li, X. W. et al. (2008). The role of pro-inflammatory factors in mediating the effects on the fetus of prenatal undernutrition: implications for schizophrenia. *Schizophr Res*, 99(1-3), 48-55.
- Shifman, S., Johannesson, M., Bronstein, M., Chen, S. X., Collier, D. A., Craddock, N. J. et al. (2008). Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS Genet*, 4(2), e28.
- Shinkai, T., De Luca, V., Utsunomiya, K., Sakata, S., Inoue, Y., Fukunaka, Y. et al. (2008). Functional polymorphism of the human multidrug resistance gene (MDR1) and polydipsia-hyponatremia in schizophrenia. *Neuromolecular Med*, 10(4), 362-367.
- Skarke, C., Kirchhof, A., Geisslinger, G., & Lotsch, J. (2005). Rapid genotyping for relevant CYP1A2 alleles by pyrosequencing. *Eur J Clin Pharmacol*, 61(12), 887-892.
- Smith, R. C., Segman, R. H., Golcer-Dubner, T., Pavlov, V., & Lerer, B. (2008). Allelic variation in ApoC3, ApoA5 and LPL genes and first and second generation antipsychotic effects on serum lipids in patients with schizophrenia. *Pharmacogenomics J*, 8(3), 228-236.
- Smythies, J., & Galzigna, L. (1998). The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim Biophys Acta*, 1380(2), 159-162.

- Spear, B. B., Heath-Chiozzi, M., & Huff, J. (2001). Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*, 7(5), 201-204.
- Steen, V. M., Andreassen, O. A., Daly, A. K., Tefre, T., Borresen, A. L., Idle, J. R. et al. (1995). Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*, 5(4), 215-223.
- Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu, D. et al. (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, 460(7256), 744-747.
- Steimer, W. (2010). Pharmacogenetics and psychoactive drug therapy: ready for the patient? *Ther Drug Monit*, 32(4), 381-386.
- Steinke, J. W., & Borish, L. (2006). 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S441-5.
- Stranger, B. E., Stahl, E. A., & Raj, T. (2010). Progress and Promise of Genome-wide Association Studies for Human Complex Trait Genetics. *Genetics*.
- Sullivan, P. F. (2005). The genetics of schizophrenia. *PLoS Med*, 2(7), e212.
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*, 60(12), 1187-1192.
- Sun, J., Jia, P., Fanous, A. H., van den Oord, E., Chen, X., Riley, B. P. et al. (2010). Schizophrenia gene networks and pathways and their applications for novel candidate gene selection. *PLoS One*, 5(6), e11351.
- Sun, J., Kuo, P. H., Riley, B. P., Kendler, K. S., & Zhao, Z. (2008). Candidate genes for schizophrenia: a survey of association studies and gene ranking. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(7), 1173-1181.
- Szekeres, G., Keri, S., Juhasz, A., Rimanoczy, A., Szendi, I., Czimmer, C. et al. (2004). Role of dopamine D3 receptor (DRD3) and dopamine transporter (DAT) polymorphism in cognitive dysfunctions and therapeutic response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 124B(1), 1-5.
- Tan, E. C., Chong, S. A., Wang, H., Chew-Ping Lim, E., & Teo, Y. Y. (2005). Gender-specific association of insertion/deletion polymorphisms in the nogo gene and chronic schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res*, 139(2), 212-216.
- Tejedor, D., Castillo, S., Mozas, P., Jimenez, E., Lopez, M., Tejedor, M. T. et al. (2005). Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*, 51(7), 1137-1144.
- Tiwari, A. K., Zai, C. C., Muller, D. J., & Kennedy, J. L. (2010). Genetics in schizophrenia: where are we and what next? *Dialogues Clin Neurosci*, 12(3), 289-303.

- Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J., & Hutchinson, I. V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24(1), 1-8.
- Ucok, A., Incesu, C., Aker, T., & Erkoc, S. (2007). Sexual dysfunction in patients with schizophrenia on antipsychotic medication. *Eur Psychiatry*, 22(5), 328-333.
- Urakubo, A., Jarskog, L. F., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res*, 47(1), 27-36.
- Van Os, J., & Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *Lancet*, 374(9690), 635-645.
- Vazquez-Bourgon, J., Arranz, M. J., Mata, I., Pelayo-Teran, J. M., Perez-Iglesias, R., Medina-Gonzalez, L. et al. (2010). Serotonin transporter polymorphisms and early response to antipsychotic treatment in first episode of psychosis. *Psychiatry Res*, 175(3), 189-194.
- Veling, W., Susser, E., van Os, J., Mackenbach, J. P., Selten, J. P., & Hoek, H. W. (2008). Ethnic density of neighborhoods and incidence of psychotic disorders among immigrants. *Am J Psychiatry*, 165(1), 66-73.
- Vuillermot, S., Weber, L., Feldon, J., & Meyer, U. (2010). A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci*, 30(4), 1270-1287.
- Wang, J. S., Ruan, Y., Taylor, R. M., Donovan, J. L., Markowitz, J. S., & DeVane, C. L. (2004). The brain entry of risperidone and 9-hydroxyrisperidone is greatly limited by P-glycoprotein. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7(4), 415-419.
- Wang, L., Yu, L., He, G., Zhang, J., Zhang, A. P., Du, J. et al. (2007). Response of risperidone treatment may be associated with polymorphisms of HTT gene in Chinese schizophrenia patients. *Neurosci Lett*, 414(1), 1-4.
- Watanabe, Y., Muratake, T., Kaneko, N., Fukui, N., Nara, Y., & Someya, T. (2007). No association between the tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms and schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry research*, 153(1), 1-6.
- Watanabe, Y., Nunokawa, A., Kaneko, N., & Someya, T. (2010). A case-control study and meta-analysis of association between a common copy number variation of the glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) gene and schizophrenia. *Schizophr Res*, 124(1-3), 236-237.
- Wei, Z., Wang, L., Xuan, J., Che, R., Du, J., Qin, S. et al. (2009). Association analysis of serotonin receptor 7 gene (HTR7) and risperidone response in Chinese schizophrenia patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(3), 547-551.
- Wenzlaff, A. S., Cote, M. L., Bock, C. H., Land, S. J., Santer, S. K., Schwartz, D. R. et al. (2005). CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*, 26(12), 2207-2212.

- Weusten, J. J., Blankenstein, M. A., Gmelig-Meyling, F. H., Schuurman, H. J., Kater, L., & Thijssen, J. H. (1986). Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 112(3), 409-414.
- Wirshing, D. A., Wirshing, W. C., Kysar, L., Berisford, M. A., Goldstein, D., Pashdag, J. et al. (1999). Novel antipsychotics: comparison of weight gain liabilities. *J Clin Psychiatry*, 60(6), 358-363.
- Xing, Q., Gao, R., Li, H., Feng, G., Xu, M., Duan, S. et al. (2006). Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*, 7(7), 987-993.
- Xu, M., Li, S., Xing, Q., Gao, R., Feng, G., Lin, Z. et al. (2010). Genetic variants in the BDNF gene and therapeutic response to risperidone in schizophrenia patients: a pharmacogenetic study. *Eur J Hum Genet*, 18(6), 707-712.
- Xuan, J., Zhao, X., He, G., Yu, L., Wang, L., Tang, W. et al. (2008). Effects of the dopamine D3 receptor (DRD3) gene polymorphisms on risperidone response: a pharmacogenetic study. *Neuropsychopharmacology*, 33(2), 305-311.
- Yamanouchi, Y., Iwata, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Ikeda, M., & Ozaki, N. (2003). Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone. *Pharmacogenomics J*, 3(6), 356-361.
- Yasui-Furukori, N., Mihara, K., Takahata, T., Suzuki, A., Nakagami, T., De Vries, R. et al. (2004). Effects of various factors on steady-state plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone: lack of impact of MDR-1 genotypes. *Br J Clin Pharmacol*, 57(5), 569-575.
- Yasui-Furukori, N., Saito, M., Tsuchimine, S., Nakagami, T., Sato, Y., Sugawara, N. et al. (2008). Association between dopamine-related polymorphisms and plasma concentrations of prolactin during risperidone treatment in schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(6), 1491-1495.
- Yevtushenko, O. O., Cooper, S. J., O'Neill, R., Doherty, J. K., Woodside, J. V., & Reynolds, G. P. (2008). Influence of 5-HT2C receptor and leptin gene polymorphisms, smoking and drug treatment on metabolic disturbances in patients with schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 192(6), 424-428.
- Young, R. M., Lawford, B. R., Barnes, M., Burton, S. C., Ritchie, T., Ward, W. K. et al. (2004). Prolactin levels in antipsychotic treatment of patients with schizophrenia carrying the DRD2\*A1 allele. *Br J Psychiatry*, 185, 147-151.
- Zajacka, J., Fawcett, J., Schaff, M., Jeffriess, H., & Guy, C. (1991). The role of serotonin in sexual dysfunction: fluoxetine-associated orgasm dysfunction. *J Clin Psychiatry*, 52(2), 66-68.
- Zalsman, G., Frisch, A., Lev-Ran, S., Martin, A., Michaelovsky, E., Bensason, D. et al. (2003). DRD4 exon III polymorphism and response to risperidone in Israeli adolescents with schizophrenia: a pilot pharmacogenetic study. *Eur Neuropsychopharmacol*, 13(3), 183-185.

- Zalsman, G., Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Burke, A. K., Hu, X. Z., Brent, D. A. et al. (2006). Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. *Am J Psychiatry*, 163(9), 1588-1593.
- Zanger, U. M., Raimundo, S., & Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369(1), 23-37.
- Zhang, A., Xing, Q., Qin, S., Du, J., Wang, L., Yu, L. et al. (2007). Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in Chinese populations. *Pharmacogenomics J*, 7(5), 333-338.
- Zhou, S. F., Di, Y. M., Chan, E., Du, Y. M., Chow, V. D., Xue, C. C. et al. (2008). Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab*, 9(8), 738-784.

**Páginas web:**

- 1000 Genomes. A Deep Catalog of Human Genetic Variation.  
<http://www.1000genomes.org/>
- FDA. Table of Valid Genomic Biomarkers in the Context of Approved Drug Labels.  
<http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>
- National Human Genome Research Institute. [www.genome.gov](http://www.genome.gov)



*Anexos*

## 4.1. Escala para el Síndrome Positivo y Negativo de la Esquizofrenia (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS)

1. Delirios	1	2	3	4	5	6	7
2. Desorganización conceptual	1	2	3	4	5	6	7
3. Alucinaciones	1	2	3	4	5	6	7
4. Excitación	1	2	3	4	5	6	7
5. Grandiosidad	1	2	3	4	5	6	7
6. Susplicia/perjuicio	1	2	3	4	5	6	7
7. Hostilidad	1	2	3	4	5	6	7
<b>Escala positiva (PANSS-P)</b>	<b>Puntuación directa:</b>			<b>Percentil:</b>			
1. Embotamiento afectivo	1	2	3	4	5	6	7
2. Retraimiento emocional	1	2	3	4	5	6	7
3. Contacto pobre	1	2	3	4	5	6	7
4. Retraimiento social	1	2	3	4	5	6	7
5. Pensamiento abstracto	1	2	3	4	5	6	7
6. Fluidez de la conversación	1	2	3	4	5	6	7
7. Pensamiento estereotipado	1	2	3	4	5	6	7
<b>Escala negativa (PANSS-N)</b>	<b>Puntuación directa:</b>			<b>Percentil:</b>			
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Escala compuesta (PANSS-C)</b>	<b>Puntuación directa:</b>			<b>Percentil:</b>			
1. Preocupación somática	1	2	3	4	5	6	7
2. Ansiedad	1	2	3	4	5	6	7
3. Sentimientos de culpa	1	2	3	4	5	6	7
4. Tensión motora	1	2	3	4	5	6	7
5. Manierismos/posturas	1	2	3	4	5	6	7
6. Depresión	1	2	3	4	5	6	7
7. Enlentecimiento motor	1	2	3	4	5	6	7
8. Falta de colaboración	1	2	3	4	5	6	7
9. Pensamientos inusuales	1	2	3	4	5	6	7
10. Desorientación	1	2	3	4	5	6	7
11. Atención deficiente	1	2	3	4	5	6	7
12. Ausencia de <i>insight</i>	1	2	3	4	5	6	7
13. Trastornos de la volición	1	2	3	4	5	6	7
14. Control deficiente de los impulsos	1	2	3	4	5	6	7
15. Ensimismamiento	1	2	3	4	5	6	7
16. Evitación social activa	1	2	3	4	5	6	7
<b>Psicopatología general (PANSS-PG)</b>	<b>Puntuación directa:</b>			<b>Percentil:</b>			
	1	2	3	4	5	6	7





Nombre ..... Historia .....  
 Evaluador ..... Fecha .....

**Escala de efectos secundarios UKU (Udvalg für Kliniske Undersøgelser)**

Síntoma	No explorado	Gravedad			Relación causal			
		No / dudoso	Leve	Moderado	Grave	Improbable	Posible	Probable
Efectos psíquicos								
Dificultad de concentración								
Asíntia / fatiga / fatigabilidad								
Somnolencia / sedación								
Alteraciones mnémicas								
Depresión								
Tensión / inquietud								
Aumento de la duración sueño								
Disminución de la duración sueño								
Aumento de los sueños								
Indiferencia emocional								
Efectos neurológicos								
Distonía								
Rigidez								
Hiporreflexia / anestesia								
Hiperreflexia								
Temblor								
Acatetosis								
Convulsiones epilépticas								
Parosistias								
Efectos autonómicos								
Trastornos de acomodación								
Aumento de la salivación								
Disminución de la salivación								
Náusea / vómito								
Diarrea								
Estreñimiento								
Alteraciones de la micción								
Poturia / polidipsia								
Vértigo ortostático								
Palpitaciones / taquicardia								
Aumento de la sudoración								

Síntoma	No explorado	Gravedad				Relación causal		
		No / dudoso	Leve	Moderado	Grave	Improbable	Posible	Probable
Otros efectos								
Exantema morbiliforme								
Exantema pequelual								
Exantema urticarial								
Exantema pústuloso								
Exantema indurificable								
Prurito								
Fotosensibilidad								
Aumento de la pigmentación								
Aumento de peso								
Pérdida de peso								
Menorragia								
Amenorrea								
Galactorrea								
Ginecomastia								
Aumento del deseo sexual								
Disminución del deseo sexual								
Disfunción erectil								
Disfunción eyaculatoria								
Disfunción orgásmica								
Disfunción de la lubricación vaginal								
Cefalea tensional								
Cefalea migrañosa								
Cefalea (otras formas)								
Dependencia física								
Dependencia psíquica								

Valoración de la interferencia de los efectos secundarios sobre el funcionamiento diario del paciente	Evaluador	
	Paciente	Médico
0 Sin efectos secundarios		
1 Sin interferencia significativa		
2 Interferencia moderada		
3 Interferencia marcada		
Consecuencia		
0 Ninguna acción		
1 No reducción de dosis / tratamiento de efectos secundarios		
2 Reducción de dosis		
3 Retirada de medicación o cambio		

Lingjaard O., Ahlors U.G., Bech P., Dencker S.J., Ege K. "The UKU side effect rating scale". Acta Psychiatr Scand 1987; 76 (Suppl 334): 1-100  
 (Instrucciones para la administración en Martínez Azumendi O. *Psiquiatría en la comunidad y neuropsíquicos de acción prolongada*, pág. 106)

TRATAMIENTOS	N	%
<b>Anticolinérgicos</b>	<b>36</b>	<b>16,4%</b>
Biperideno	36	16,4%
<b>Antidepresivos</b>	<b>29</b>	<b>13,2%</b>
Citalopram	3	1,4%
Fluoxetina	1	0,4%
Fluvoxamina	3	1,4%
Mirtazapina	4	1,8%
Paroxetina	6	2,7%
Reboxetina	2	0,9%
Sertralina	3	1,4%
Venlafaxina	7	3,2%
<b>Antiepilépticos</b>	<b>26</b>	<b>11,9%</b>
Carbamazepina	5	2,3%
Gabapentina	3	1,4%
Lamotrigina	1	0,4%
Oxcarbazepina	10	4,6%
Valproico	7	3,2%
<b>Antipsicóticos atípicos</b>	<b>19</b>	<b>8,7%</b>
Amisulpirida	9	4,1%
Aripiprazol	4	1,8%
Clozapina	2	0,9%
Olanzapina	3	1,4%
Ziprasidona	1	0,4%
<b>Antipsicóticos clásicos</b>	<b>38</b>	<b>17,3%</b>
Clorpromazina	1	0,4%
Clotiapina	6	2,7%
Flufenazina	10	4,6%
Haloperidol	1	0,4%
Levomepromazina	8	3,6%
Tioridazina	2	0,9%
Zuclopentixol	10	4,6%
<b>Benzodiazepinas</b>	<b>84</b>	<b>38,3%</b>
Alprazolam	1	0,4%
Clonazepam	13	5,9%
Clorazepato	32	14,6%
Diazepam	17	7,8%
Flurazepam	2	0,9%
Lorazepam	11	5%
Lormetazepam	8	3,6%
<b>Litio</b>	<b>4</b>	<b>2,2%</b>



Anexo 4. Frecuencias alélicas de las variantes del PHARMAChip en los pacientes

Gen	Alelo	N	Frecuencia
<b>METABOLISMO DE FASE I</b>			
<b>CYP1A1</b>	*1	434	0,935
	*2B	30	0,065
<b>CYP1A2</b>	*1	149	0,325
	*1C	1	0,002
	*1F	308	0,672
<b>CYP2B6</b>	516C	339	0,732
	516T	125	0,278
<b>CYP2C19</b>	*1	384	0,827
	*2	78	0,168
	*4	1	0,002
	*8	0	0,000
<b>CYP2C8</b>	*10	1	0,002
	*1	365	0,787
	*2	1	0,002
	*3	70	0,151
<b>CYP2C9</b>	*4	28	0,060
	*1	365	0,787
	*2	66	0,142
	*3	33	0,071
<b>CYP2D6</b>	*6	0	0,000
	*1	171	0,387
	*2	84	0,191
	*3	6	0,014
	*4	81	0,184
	*5	7	0,016
	*6	1	0,002
	*9	14	0,032
	*10	12	0,027
	*17	1	0,002
	*35	16	0,036
	*41	37	0,084
	*1XN	5	0,011
	*2XN	4	0,009
	*4XN	0	0,000
<b>CYP3A4</b>	*41XN	1	0,002
	*1	449	0,972
<b>CYP3A5</b>	*1B	13	0,028
	*1	22	0,048
	*3	438	0,948
	*6	2	0,004

Gen	Alelo	N	Frecuencia
<b>METABOLISMO DE FASE II</b>			
<b>GSTM1</b>	0	118	0,509
	1	114	0,491
<b>GSTM3</b>	*A	382	0,823
	*B	82	0,177
<b>GSTP1</b>	*A (Ile)	313	0,675
	*B (Val)	151	0,325
<b>GSTT1</b>	0	47	0,203
	1	185	0,797
<b>NAT2</b>	*4	112	0,243
	*5A	7	0,015
	*5B	182	0,396
	*5C	6	0,013
	*5D	--	--
	*5J	2	0,004
	*6A	128	0,278
	*6B	--	--
	*6C	--	--
	*7A	--	--
	*7B	12	0,026
<b>TPMT</b>	*11A	--	--
	*12A	3	0,006
	*12B	--	--
	*12C	6	0,013
	*13	1	0,002
	*14A	1	0,002
<b>UGT1A1</b>	*14B	--	--
	*1	446	0,961
	*2	2	0,004
	*3A	13	0,028
	*3B	3	0,006
	*1	297	0,654
	*28	157	0,346

Gen	Alelo	N	Frecuencia
<b>TRANSPORTADORES</b>			
<b>MDR1</b>	3435C	249	0,537
	3435T	215	0,463
<b>SLC6A4</b>	Ins (L)	247	0,546
	Del (S)	205	0,454

Gen	Alelo	N	Frecuencia
RECEPTORES			
<i>ADRB1</i>	389Arg	339	0,731
	389Gly	125	0,269
<i>ADRB2</i>	16Arg	344	0,259
	16Gly	120	0,741
<i>AGTR1</i>	1166A	327	0,705
	1166C	137	0,295
<i>BDKRB2</i>	58C	267	0,575
	58T	197	0,425
<i>DRD3</i>	9Ser	314	0,677
	9Gly	150	0,323
<i>GRIN2B</i>	2667C	366	0,789
	2667T	98	0,211
<i>HTR2A</i>	-102C	257	0,554
	-102T	207	0,446
	452His	419	0,903
	452Tyr	45	0,097

Gen	Alelo	N	Frecuencia
OTROS			
<i>ADD1</i>	460Gly	85	0,183
	460Trp	379	0,817
<i>AGT</i>	235Met	186	0,401
	235Thr	278	0,599
<i>BCHE</i>	70Asp	454	0,979
	70Gly	10	0,021
	539Ala	386	0,832
	539Thr	78	0,168
<i>COMT</i>	108Val	241	0,519
	108Met	223	0,481
<i>ERCC2</i>	751Gln	301	0,649
	751Lys	163	0,351
<i>IL-10</i>	-1082G	158	0,341
	-1082A	306	0,659
<i>MTHFR</i>	677C	302	0,651
	677T	162	0,349
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	-308G	408	0,879
	-308A	56	0,121
<i>TYMS</i>	Del 6ps	151	0,328
	Ins 6pb	309	0,672
<i>VKORC1</i>	-1639A	245	0,528
	-1639G	219	0,472

Gen	Genotipo	N	Frecuencia
METABOLISMO DE FASE I			
<b>CYP1A1</b>	*1/*1	217	0,395
	*1/*2B	15	0,065
	*2B/*2B	0	0,000
<b>CYP1A2</b>	*1/*1	23	0,100
	*1/*1C	0	0,000
	*1/*1F	103	0,450
	*1C/*1F	1	0,005
<b>CYP2B6</b>	*1F/*1F	102	0,445
	G/G	124	0,535
	G/T	91	0,392
<b>CYP2C19</b>	T/T	17	0,073
	*1/*1	161	0,694
	*1/*2	60	0,259
	*1/*4	1	0,004
	*1/*8	0	0,000
	*1/*10	1	0,004
	*2/*2	9	0,039
	*2/*4	0	0,000
	*1/*1	143	0,616
	*1/*2	1	0,004
<b>CYP2C8</b>	*1/*3	54	0,233
	*1/*4	24	0,104
	*2/*3	0	0,000
	*3/*3	6	0,026
	*3/*4	4	0,017
	*4/*4	0	0,000
	*1/*1	142	0,612
	*1/*2	53	0,228
	*1/*3	28	0,121
	*2/*2	4	0,017
<b>CYP2C9</b>	*2/*3	5	0,022
	*3/*3	0	0,000
	*3/*6	0	0,000
	*1/*1	218	0,944
	*1/*1B	13	0,056
<b>CYP3A4</b>	*1B/*1B	0	0,000
	*1/*1	1	0,004
<b>CYP3A5</b>	*1/*3	20	0,086
	*3/*3	208	0,901
	*3/*6	2	0,009

Gen	Genotipo	N	Frecuencia
METABOLISMO DE FASE II			
<b>GSTM1</b>	Presente	114	0,491
	Ausente	118	0,509
<b>GSTM3</b>	*A/*A	159	0,685
	*A/*B	64	0,276
	*B/*B	9	0,039
<b>GSTP1</b>	*A/*A	103	0,444
	*A/*B	107	0,461
	*B/*B	22	0,095
<b>GSTT1</b>	Ausente	47	0,203
	Presente	185	0,797
<b>TPMT</b>	*1/*1	214	0,922
	*1/*2	2	0,009
	*1/*3A	13	0,056
	*1/*3C	3	0,013
<b>UGT1A1</b>	*3C/*3C	0	0,000
	*1/*1	97	0,427
	*1/*28	103	0,453
	*28/*28	27	0,120

Gen	Genotipo	N	Frecuencia
TRANSPORTADORES			
<b>MDR1</b>	C/C	72	0,310
	C/T	105	0,453
	T/T	55	0,237
<b>SLC6A4</b>	L/L	69	0,305
	L/S	109	0,482
	S/S	48	0,213



Gen	Genotipo	N	Frecuencia
RECEPTORES			
<b>ADRB1</b>	Arg/Arg	129	0,556
	Arg/Gly	81	0,349
	Gly/Gly	22	0,095
<b>ADRB2</b>	Arg/Arg	151	0,651
	Arg/Gly	42	0,181
	Gly/Gly	39	0,168
<b>AGTR1</b>	A/A	114	0,491
	A/C	99	0,427
	C/C	19	0,082
<b>BDKRB2</b>	C/C	79	0,340
	C/T	109	0,470
	T/T	44	0,190
<b>DRD3</b>	Ser/Ser	101	0,435
	Ser/Gly	112	0,483
	Gly/Gly	19	0,082
<b>GRIN2B</b>	C/C	148	0,638
	C/T	70	0,302
	T/T	14	0,060
<b>HTR2A</b>	C/C	74	0,319
	C/T	109	0,470
	T/T	49	0,211
	His/His	187	0,806
	His/Tyr	45	0,194
	Tyr/Tyr	0	0,000

Gen	Genotipo	N	Frecuencia
OTROS			
<b>ADD1</b>	Trp/Trp	11	0,047
	Trp/Gly	63	0,272
	Gly/Gly	158	0,681
<b>AGT</b>	Thr/Thr	33	0,142
	Thr/Met	120	0,517
	Met/Met	79	0,341
	Asp/Asp	222	0,957
	Asp/Gly	10	0,043
<b>BCHE</b>	Gly/Gly	0	0,000
	Ala/Ala	162	0,699
	Ala/Thr	62	0,267
	Thr/Thr	8	0,034
<b>COMT</b>	Val/Val	64	0,276
	Val/Met	113	0,487
	Met/Met	55	0,237
<b>ERCC2</b>	Lys/Lys	94	0,276
	Lys/Gln	113	0,487
	Gln/Gln	25	0,108
<b>IL-10</b>	G/G	31	0,134
	G/A	96	0,414
	A/A	105	0,452
<b>MTHFR</b>	C/C	91	0,392
	C/T	120	0,517
	T/T	21	0,091
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	G/G	179	0,771
	G/A	50	0,216
	A/A	3	0,013
<b>TYMS</b>	Del/Del	27	0,117
	Del/Ins	97	0,421
	Ins/Ins	106	0,460
<b>VKORC1</b>	G/G	55	0,237
	G/A	135	0,582
	A/A	42	0,181

Gen	p DE LA COMPARACIÓN ( $\chi^2$ )					
	Frecuencias alélicas			Frecuencias genotípicas		
	Global	Mujeres	Hombres	Global	Mujeres	Hombres
<b>COMT</b>	0,360	0,874	0,197	0,659	0,779	0,300
<b>CYP1A2</b>	0,277	0,066	0,776	0,261	0,230	0,394
<b>CYP2D6</b>	--	--	--	0,595	0,984	0,234
<b>DRD3</b>	0,568	0,927	0,289	0,753	0,71	0,558
<b>GRIN2B</b>	0,124	0,683	0,166	0,153	0,714	0,189
<b>GSTM1</b>	--	--	--	0,617	0,713	0,504
<b>GSTT1</b>	--	--	--	0,504	0,597	0,617
<b>HTR2A</b>	0,555	0,385	0,154	0,677	0,355	0,293
<b>HTR2A</b>	0,761	0,659	0,711	0,929	0,908	0,894
<b>IL-10</b>	0,027*	0,027*	0,252*	0,020*	0,008*	0,502
<b>MTHFR</b>	0,311	0,796	0,800	0,156	0,466	0,370
<b>SLC6A4</b>	0,085	0,055	0,394	0,316	0,257	0,496
<b>TNF</b>	0,284	0,961	0,179	0,535	0,515	0,157





For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: screening in a Spanish population

**Aims:** How genes affect the response in a patient to a given medication is still poorly understood; the validation of biomarkers and technologies need to be performed. This study aims to determine the analytical characteristics of PHARMACHip®, a newly developed pharmacogenetic array, and the Spanish population allelic and genotypic frequencies of the genetic variants included in this chip. **Materials & methods:** The analytical characteristics of PHARMACHip assessed were sensitivity and specificity (for *CYP2D6* and *SLC6A4*), accuracy (for *SLC6A4*) and genotyping rate: frequencies of the 90 pharmacogenetic variants of 36 genes were included in PHARMACHip. These were compared in 449 Spanish subjects with data reported in Caucasians. **Results & conclusion:** Sensitivity and specificity ranged from 96–100%, accuracy was 94.8% and genotyping success rate was 99.6%. PHARMACHip is an accurate, rapid and updatable tool, which may be especially useful for cytochrome P450 testing. The allelic and genotypic frequencies found in the Spanish subjects reinforce the need for establishing possible intraethnic differences among populations prior to performing this kind of study.

**KEYWORDS:** accuracy ■ *CYP2D6* ■ PHARMACHip® array ■ pharmacogenetics ■ sensitivity ■ *SLC6A4* ■ specificity ■ successful genotyping rate

Berta Almoguera, Rosa Riveiro-Alvarez, Belen Gomez-Dominguez, Rosario Lopez-Rodriguez, Pedro Dorado, Concepción Vaquero-Lorenzo, Rafael Dal-Ré, Jose Fernandez-Piqueras, Adrián LLerena, Francisco Abad-Santos, Carmen Ayuso<sup>†</sup> & the Spanish Consortium of Pharmacogenetics Research in Schizophrenia

<sup>†</sup>Author for correspondence: Genetics Department, CAIBER Unit, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain and CIBERER ISCIII, Madrid, Spain  
Tel.: +34 915 504 872  
Fax: +34 915 504 849  
[cayuso@fjd.es](mailto:cayuso@fjd.es)  
For a full list of affiliations and Consortium members please see the back page

Predictive medicine is becoming more accurate and useful through pharmacogenetics (PGt), which allows the identification of the genetic basis of interindividual variability in the response to drugs. The underlying assumption is that a person's genotype could help determine whether they will respond to, or have toxicity from, a given medication [1].

The search in PGt has been facilitated by a revolutionary increase in genotyping technologies, mainly microarray based, that enable low time-consuming and cost-effective genotyping. This high-throughput technology has yielded a large amount of data that should be carefully analyzed as the contribution of genetics to interindividual variation in response to medication remains incompletely understood. Another point is the need to determine the analytical and clinical validity of emerging PGt testing methods, before their implementation in clinical practice.

To date there exist some genetic biomarkers that have been approved by the US FDA as clinically useful in therapeutic management [101]. These markers are mainly genetic variants in pharmacokinetic targets such as *CYP2C19*, *CYP2C9* and *CYP2D6* (CYP450 super family members), and Phase II *N*-acetyltransferase 2 (NAT2), UDP-glucuronosyltransferase 1 A1 (UGT1A1) and thiopurine *S*-methyltransferase (TPMT). Variations in the metabolic activity

of these enzymes have been related to poor therapeutic response, and even the occurrence of adverse events [101].

We conducted a study of analytical validity of a newly developed PGt tool, called PHARMACHip®. We employed genetic variants that have been reported to influence drug metabolism, including those approved by the FDA. This tool is currently commercially available to assess the genetic background of variants related to therapeutic outcome (summarized in SUPPLEMENTARY TABLE 1; [WWW.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.10.131](http://WWW.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.10.131)).

The aims of this study were twofold: to determine the analytical characteristics of the PHARMACHip array in terms of sensitivity (S) and specificity (SP) of *CYP2D6* and *SLC6A4*, using PCR-based and variable number of tandem repeat (VNTR) analysis as gold-standards, as well as the accuracy and genotyping rate in order to assess its potential usefulness in routine clinical practice and to investigate the allelic and genotypic frequencies of all the genetic variants included in PHARMACHip (SUPPLEMENTARY TABLE 1) in a Spanish control population.

### Materials & methods

#### ■ Sample selection

A total of 449 unrelated Caucasian adults (>18 years of age), Spanish healthy volunteers, of which 206 were male (45.9%), with no

future  
medicine part of fsg

## Tables

**Table 1.** Allelic and genotypic frequencies of -1082G>A and -592C>A IL-10 gene promoter variants

	Males						Females					
	Control (n=201)		Schizophrenia (n=153)			p	Control (n=234)		Schizophrenia (n=88)			p
Age (years)	37±18		45±13			0.000	39±18		46±13			0.002
<b>-1082G&gt;A</b>												
Allelic frequencies	n	%	n	%	OR (95%CI)	p	n	%	n	%	OR (95% CI)	p
G	164	40.8%	111	36.3%	1.21 (0.88-1.66)	0.252	198	42.3%	57	32.4%	1.53 (1.04-2.25)	0.027*
A	238	59.2%	195	63.7%			270	57.7%	119	67.6%		
Genotypic frequencies	n	%	n	%		p	n	%	n	%		p
G/G	38	18.9%	23	15.0%		0.502	33	14.1%	11	12.5%		0.008*
G/A	88	43.8%	65	42.5%			132	56.4%	35	39.8%		
A/A	75	37.3%	65	42.5%			69	29.5%	42	47.7%		
	Control (n=181)		Schizophrenia (n=153)				Control (n=200)		Schizophrenia (n=88)			
<b>-592 C&gt;A</b>												
Allelic frequencies	n	%	n	%	OR (95%CI)	p	n	%	n	%	OR (95% CI)	p
C	274	75.7%	227	72.8%	1.11 (0.77-1.60)	0.618	298	74.5%	123	69.1%	0.76 (0.51-1.15)	0.213
A	88	24.3%	79	25.3%			102	25.5%	53	29.8%		
Genotypic frequencies												
C/C	110	60.8%	84	53.8%		0.134	106	53.0%	47	52.8%		0.004*
C/A	54	29.8%	59	37.8%			86	43.0%	29	32.6%		
A/A	17	9.4%	10	6.4%			8	4.0%	12	13.5%		

**Table 2.** Allelic and genotypic frequencies of IL-10 gene promoter haplotypes in schizophrenic and healthy males and females

	Males					FEMALES				
	Control (n=181)		Schizophrenia (n=153)			Control (n=200)		Schizophrenia (n=88)		
Allelic frequencies	n	%	n	%	p	n	%	n	%	p
GCC	146	40.3%	111	36.3%	0.557	167	41.8%	58	33.0%	0.124
ACC	126	34.8%	115	37.6%		134	33.5%	65	36.9%	
ATA	90	24.9%	80	26.1%		99	24.8%	53	30.1%	
Genotypic frequencies										
GCC/GCC	33	18.2%	23	15.0%	0.382	26	13.0%	12	13.6%	0.003*
GCC/ACC	48	26.5%	39	25.5%		60	30.0%	20	22.7%	
GCC/ATA	32	17.7%	26	17.0%		55	27.5%	14	15.9%	
ACC/ACC	28	15.5%	22	14.4%		22	11.0%	16	18.2%	
ACC/ATA	22	12.2%	32	20.9%		30	15.0%	13	14.8%	
ATA/ATA	18	9.9%	11	7.2%		7	3.5%	13	14.8%	

**Table 3.** ATA frequencies in the female subgroup. 2 ATA means homozygosity of this allele, 1 ATA heterozygosity and 0 ATA means no copy of ATA in the genotype.

	FEMALES				
	Control (n=200)		Schizophrenia (n=88)		Equality of proportions
Number of ATA alleles	n	%	n	%	p
<b>2 ATA</b>	7	3.5%	13	14.8%	0.001*
<b>1 ATA</b>	85	42.5%	27	30.7%	0.078
<b>0 ATA</b>	108	54.0%	48	54.5%	1

**Table 4.** ORs of ATA as risk factor for schizophrenia in females

	OR	95%CI	p-value
<b>2 ATA vs. 1ATA</b>	5.85	1.91-18.90	0.000*
<b>2 ATA vs. 0ATA</b>	4.18	1.43-13.08	0.002*
<b>1 ATA vs. 0ATA</b>	0.71	0.39-1.28	0.231

# **ATA homozygosity in the *IL-10* gene promoter is a risk factor for schizophrenia in Spanish females: a case control study.**

Berta Almoguera<sup>1,2</sup>, Rosa Riveiro-Alvarez<sup>1,2</sup>, Jorge Lopez-Castroman<sup>3</sup>, Pedro Dorado<sup>4,5</sup>, Rosario Lopez-Rodriguez<sup>6,7</sup>, Pablo Fernandez-Navarro<sup>8,9</sup>, Enrique Baca-García<sup>3,10</sup>, Jose Fernandez-Piqueras<sup>2,11</sup>, Rafael Dal-Ré<sup>12</sup>, Francisco Abad-Santos<sup>6,7</sup>, Adrián LLerena<sup>4,5</sup>, Carmen Ayuso<sup>1,2, §</sup> & Spanish Consortium of Pharmacogenetics Research in Schizophrenia.

<sup>§</sup>Corresponding author

<sup>1</sup>Genetics Department, CAIBER Unit, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>CIBERER ISCIII, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Psychiatric Department, IIS - Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>CICAB, Clinical Research Centre, CAIBER Unit, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain

<sup>5</sup>CIBERSAM, ISCIII, Madrid, Spain.

<sup>6</sup>Clinical Pharmacology Department, CAIBER Unit, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain.

<sup>7</sup>CIBEREHD ISCIII, Madrid, Spain

<sup>8</sup>Cancer and Environmental Area, National Center of Epidemiology, ISCIII, Madrid, Spain.

<sup>9</sup>CIBERESP, ISCIII, Madrid, Spain

<sup>10</sup>Psychiatrics Department, Columbia University, New York, USA.

<sup>11</sup>Department of Cellular Biology and Immunology, CBMSO, CSIC-UAM, Madrid, Spain

<sup>12</sup>Department of Preventive Medicine, Public Health and Medical Immunology and Microbiology, School of Health Sciences, Rey Juan Carlos University, Madrid, Spain.